

**Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen**

Aus der Klinik für Orthopädie

**Hemmung Polyethylenpartikel induzierter Osteolysen durch Pan-
Caspase-Inhibition – Untersuchungen im partikelassozierten
murinen Osteolysemodell**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Sandra Jaeckel
aus Essen
2010

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting
1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. C. Wedemeyer
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. H.P. Jennissen

Tag der mündlichen Prüfung: 21. September 2010

Publikationen

1. Landgraeber, S., **Jaeckel, S.**, Löer, F., Wedemeyer, C., Hilken, G., Canbay, A., Totsch, M., von Knoch, M. (2009): Pan-caspase inhibition suppresses polyethylene particle-induced osteolysis. *Apoptosis* 14, 173-181.

Inhaltsverzeichnis

Publikationen.....	3
1 Einleitung.....	7
1.1 Pathogenese der Prothesenlockerung	7
1.2 Klinische Bedeutung der Prothesenlockerung	9
1.3 Apoptose.....	10
1.3.1 Caspasen.....	11
1.3.2 Extrinsischer Signalweg.....	12
1.3.3 Intrinsischer Signalweg	14
1.4 BOC-D-FMK.....	16
1.5 Mikro-CT	17
1.6 Fragestellung der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Tiermodell zur partikelinduzierten Osteolyse	20
2.1.1 Versuchsprinzip	20
2.1.2 Versuchstierhaltung	20
2.1.3 Tieranzahl	21
2.1.4 Polyethylenpartikel.....	21
2.1.5 Polyethylenpartikelaufbereitung	22
2.2 BOC-D-FMK.....	23
2.3 Partikelimplantation.....	24
2.3.1 Narkose und OP Vorbereitung.....	24
2.3.2 Durchführung der Operation	24
2.3.3 Applikation der Medikamente.....	25
2.3.4 Visiten	25
2.3.5 Euthanasierung der Versuchstiere.....	26
2.4 Präparation der Schädelknochen	26
2.5 Präparation der Calvaria	26
2.6 Histologische Aufbereitung	27
2.6.1 Hämatoxylin Eosin (HE) Färbung.....	27
2.7 Immunhistochemie	27
2.7.1 Caspase-3-cleaved-Färbung	27
2.8 Auswertung der histologischen Präparate.....	29

2.8.1	Bildanalysesystem	29
2.8.2	Qualitative Beschreibung	29
2.8.3	Quantitative Beschreibung	29
2.9	Mikro-CT	31
2.9.1	Prinzip der Mikrotomographie	32
2.9.2	Rekonstruktion der Mikro-CT-Bilder	32
2.9.3	Analyse	33
2.10	MouseTRAP 5b Assay	33
2.10.1	Versuchsprinzip	34
2.10.2	Durchführung	34
2.11	Statistik	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Tägliche postoperative Visiten	36
3.2	Qualitative histologische Analyse der Knochenschnitte	36
3.2.1	Gruppe I (Keine Partikelimplantation, Applikation von DMSO)	36
3.2.2	Gruppe II (Partikelimplantation, Applikation von DMSO)	37
3.2.3	Gruppe III (Keine Partikelimplantation, Applikation von BOC-D-FMK).....	37
3.2.4	Gruppe IV (Partikelimplantation, Applikation von BOC-D-FMK)	37
3.3	Quantitative histologische Analyse der Knochenschnitte	38
3.3.1	Mittelliniensuturfläche	38
3.3.2	Osteolysen	39
3.3.3	Gewebeverteilung	40
3.4	Immunhistochemie	42
3.4.1	Caspase-3-cleaved-Färbung	42
3.4.2	Anzahl der Osteoklasten	43
3.5	Mikro-CT	44
3.5.1	Knochenvolumen BV (Bone volume)	44
3.5.2	Relatives Knochenvolumen BV/TV (Bone density)	45
3.6	MouseTRAP 5b Assay	46
4	Diskussion	48
4.1	Versuchsmodell.....	48
4.2	Mikro-CT und Histologie im Vergleich	49
4.3	Auswertung	52

4.4	Die Rolle der Apoptose	53
4.5	Grenzen des Modells	56
4.6	Schlussfolgerung.....	57
5	Zusammenfassung.....	59
6	Literaturverzeichnis	60
7	Anhang.....	67
7.1	Bilder.....	67
7.1.1	Mittelliniensuturfläche	67
7.1.2	Gesamtgewebe.....	69
7.1.3	Mikro-CT	71
7.1.4	Caspase-3-cleaved-Färbung	74
7.2	Herstellen und Färben der Präparate.....	76
7.3	Tabellen	79
7.4	Abkürzungsverzeichnis	84
8	Danksagung.....	86

1 Einleitung

1.1 Pathogenese der Prothesenlockerung

Partikelinduzierte Osteolyse ist eine Hauptursache der aseptischen Prothesenlockerung nach totaler Hüftendoprothetik (Jacobs et al. 2001). Fortschreitende Osteolysen können zu einer Instabilität oder einem Versagen des Implantates führen und eine erneute Operation erforderlich machen.

Im Mittelpunkt der periprothetischen Osteolyse stehen Abriebpartikel, die aufgrund der Reibung des Prothesenkopfes mit der künstlichen Gelenkpfanne aus Polyethylen entstehen. Die vorherrschenden Partikel sind Polyethylenpartikel (70-90%), gefolgt von Polymethylmethacrylat-(PMMA)-Knochenzement-Partikeln, Titanpartikeln und Knochenabriebpartikeln. Die durchschnittliche Größe beträgt 0,5µm, wobei über 90% der Partikel kleiner als 0,1µm sind (Jacobs et al. 2001).

Die Abriebpartikel gelangen direkt in die Synovialflüssigkeit der nach kompletter Resektion neu gebildeten Gelenkkapsel. Eine geringe Menge anfallender Abriebpartikel kann über perivaskuläre Lymphgefäße abtransportiert werden. Kommt es zur gesteigerten Freisetzung der Partikel, dekompensiert das System und es kommt zur Bildung von Osteolysen (Willert et al. 1990). Durch eine kontinuierliche Verbindung zwischen dem Gelenkspalt und der mikroskopisch dünnen Zone zwischen dem Metall-Implantat und dem umgebenden Knochen ist das Implantat vollständig von Synovialflüssigkeit umgeben. Auf diesem Weg gelangen die Abriebpartikel an die Knochen-Implantat-Grenze (Ingham et al. 2000).

Die Anwesenheit von körperfremdem Material in der Synovia der postoperativ neu gebildeten Gelenkkapsel führt zur Rekrutierung von Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen (Revell 2008). Diese phagozytieren die Abriebpartikel an der Knochen-Implantat-Grenze und werden dadurch aktiviert. Es kommt zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen (Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF-α), Interleukin 1(IL-1) und Interleukin 6 (IL-6)) (Schwarz et al. 2000) und inflammatorischen Mediatoren (PGE2). Diese Immunantwort ist abhängig von Zusammensetzung, Größe, Form, Volumen und Anzahl der Partikel (Ingham et al. 2000). Die Zytokine und Mediatoren initiieren eine komplexe osteolytische

Kaskade, an deren Ende eine gesteigerte Proliferation und Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten steht (Sandell, Silva 2001). Osteoklasten sind spezialisierte Zellen, die für die Knochenresorption im normalen Knochenstoffwechsel sowie in pathologischen Prozessen verantwortlich sind (Revell 2008). Der normale Knochenstoffwechsel beruht auf einem Gleichgewicht von Knochenneubildung und Knochenresorption. Dieser komplexe Mechanismus involviert das koordinierte Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten (Jacobs et al. 2001).

Die Beteiligung von Osteoblasten an der partikelinduzierten Osteolyse wurde bislang nur in vitro getestet. Verschiedene Partikelarten haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Proliferation und Aktivität der Osteoblasten. Polyethylenpartikel werden außer von Osteoklasten und Makrophagen auch von Osteoblasten phagozytiert. Die phagozytierten Partikel mindern die Expression von Kollagen Typ I und III sowie die Matrixproduktion, wodurch die Knochensynthese behindert wird. PMMA Partikel hemmen die Proliferation der Osteoblasten. So tragen Osteoblasten durch die Hemmung der Knochenneubildung zum osteolytischen Geschehen bei (Purdue et al. 2007).

Des Weiteren werden Fibroblasten durch die von Makrophagen ausgeschütteten Zytokine und Mediatoren angezogen. Sie produzieren Kollagene und Glycosaminoglycane und ersetzen so den resorbierten Knochen durch eine Bindegewebsmembran (Landgraeber et al. 2008). Ferner können Fibroblasten, die mit Abriebpartikeln in Kontakt gekommen sind, die Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen in reife Osteoklasten unterstützen und deren Aktivierung steigern (Purdue et al. 2007).

Da der periprothetische osteolytische Prozess schließlich eine Knochenresorption bedingt, lag der Fokus der bisherigen Forschung auf der Rolle der Osteoklasten (Sandell, Silva 2001). Neben den beschriebenen, rein inflammatorischen Vorgängen, scheinen auch apoptotische Zellreaktionen eine Rolle bei der Aktivierung der Osteolysenbildung zu spielen. Dieser Aspekt wurde bisher jedoch nur von wenigen Autoren thematisiert (Landgraeber et al. 2008, Landgraeber et al. 2006, Huk et al. 2001, Wang et al. 2003, Zhang, Revell 1999).

1.2 Klinische Bedeutung der Prothesenlockerung

Weltweit werden jährlich über 1 Millionen Hüftendoprothesen implantiert (Purdue et al. 2007). Somit zählt der künstliche Hüftersatz zu den am häufigsten durchgeführten Eingriffen in der Orthopädie. Die Hauptkomplikation der totalen Hüftendoprothese ist die Lockerung der Prothese als Endstadium der periprotehetischen Osteolyse. In Langzeitstudien über einen Zeitraum von 20 Jahren konnte bei 35% der prothesenimplantierten Patienten osteolytisches Geschehen nachgewiesen werden (Harris 2001). Eine Lockerung der Prothese, die auf partikelinduzierte Osteolyse zurück zu führen ist, tritt über diesen Zeitraum bei 20% der Patienten auf (Kim et al. 1999, Purdue et al. 2007).

Im Falle einer Lockerung kann die gelockerte Prothese im Rahmen einer Revisionsoperation ausgetauscht werden (Wülker Taschenlehrbuch Orthopädie und Unfallchirurgie 2005). Dies stellt bisher die einzige Therapieoption bei Prothesenlockerung dar. Wiederholte Wechsel der Prothesen sind aufgrund der Schädigung von Knochen und Weichteilen problematisch. Callaghan et al. zeigten in einer Studie, dass es nach einer Wechseloperation deutlich schneller zu erneuten Komplikationen bis hin zum mechanischen Versagen der Prothese kommt, als nach der Erstimplantation (Callaghan et al. 1985).

Um eine Revisionsoperation in Zukunft vermeiden oder hinauszögern zu können, wurden bisher große Anstrengungen unternommen. U.a. wurde die Materialhaltbarkeit z.B. durch den Einsatz von hochvernetztem UHMWPE verbessert, um dem Entstehen von Abriebpartikeln und somit der Komplikation der aseptischen Prothesenlockerung vorzubeugen (McKellop et al. 1999, Muratoglu et al. 2001).

Des Weiteren sind nichtinvasive Alternativen zur Prophylaxe und Therapie periprotehetischer Osteolysen erstrebenswert. Durch das zunehmende Verständnis des molekularen Mechanismus der partikelinduzierten Osteolyse werden verschiedene Ansatzpunkte für die pharmakologische Intervention ersichtlich. Der bisherige Schwerpunkt der Forschung lag auf der pharmakologischen Beeinflussung der Osteoklastenaktivierung sowie dem Stoffwechselweg der Cholesterinbiosynthese (Fisher et al. 1999, von Knoch et al. 2005 a,b,c, Wedemeyer et al. 2005).

Doch auch der Mechanismus der Apoptose wird im Rahmen der partikelinduzierten Osteolyse in einigen Studien als Option zur Prophylaxe von Prothesenlockerung diskutiert (Huk et al. 2001, Catelas et al. 1999, Distler et al. 2005, Landgraeber et al. 2008, Wedemeyer et al. 2009). Die im Folgenden erläuterten Zusammenhänge unterstützen diesen Ansatz als spezifischen therapeutischen Interventionspunkt.

1.3 Apoptose

Es werden verschiedene Formen des Zelltodes unterschieden: Apoptose, Nekrose, Autophagie und Zellalterung (Senescence).

Da es im Rahmen der aseptischen Prothesenlockerung neben inflammatorischen Prozessen zu apoptotischen Vorgängen kommt, wird dieser Mechanismus im Folgenden genauer erläutert.

Unter Apoptose versteht man die kontrollierte, durch Genexpression gesteuerte, aktive Form des Zelltodes. Dieser Vorgang ist durch folgende morphologische Veränderungen charakterisiert: Zellschrumpfung, Bildung von blasenförmigen Ausbuchtungen an der Zelloberfläche, Verklumpung des Chromatins, Schrumpfung des Zellkerns (Karyopyknose), Auflösen von Zellorganellen, Lösung von Zellkontakten und Freisetzung von Apoptosekörpern (Huk et al. 2001). Die blasenförmigen Ausbuchtungen werden vom übrigen Zellrest abgetrennt und formen sich in kleinere Partikel, die Apoptosekörper, um. Sie enthalten bestimmte zelluläre Komponenten wie Histone, DNA, RNA und ribonukleäre Proteine. Die Apoptosekörper werden kurz nach ihrer Freisetzung von in der Nähe befindlichen Makrophagen phagozytiert. Da es während des gesamten Prozesses zu keiner Freisetzung der zellulären Bestandteile kommt, wird eine akute Entzündungsreaktion im angrenzenden Gewebe vermieden (Schiller et al. 2008).

Apoptose kommt im Rahmen vieler Autoimmunerkrankungen und neurologisch degenerativen Prozessen wie Morbus Alzheimer sowie physiologisch im Rahmen der embryonalen Entwicklung und Eliminierung genetischer Mutationen vor (Huk et al. 2001). Des Weiteren konnte Apoptose im Rahmen chronischer Erkrankungen wie AIDS, bei Geweberegeneration, der Zellerneuerung und in Tumorgewebe nachgewiesen werden (Bühling et al. 2004).

Die während der aseptischen Prothesenlockerung auftretende Apoptose ist bislang wenig erforscht. Catelas et al. konnten zeigen, dass Metall-, Keramik- und Polyethylenpartikeln die Apoptose von Makrophagen in vitro induzieren können (Catelas et al. 1999). Landgraeber et al. gelang der Nachweis von Apoptose von Makrophagen, Riesenzellen und T-Lymphozyten in Gelenkkapseln und periprotetischen Interfacemembranen (fibröses Gewebe in der Trennschicht zwischen Endoprothese und Knochen) in Patienten mit aseptischer Lockerung der Hüftendoprothese in vivo (Landgraeber et al. 2006).

1.3.1 Caspasen

Caspasen (Cystein-dependent aspartate-specific proteases) sind die zentralen Mediatoren der Apoptose. In humanen Zellen wurden mehr als ein Dutzend Caspasen identifiziert, die in zwei Gruppen, nämlich inflammatorische und apoptotische Caspasen, eingeteilt werden (Chowdhury et al. 2008). Die apoptotischen Caspasen werden weiter unterteilt in Initiator Caspasen (Caspase-1, -2, -4, -5, -8, -10) und Effektor Caspasen (Caspase-3, -6, -7, -9) (Villa et al. 1997). Die Initiator Caspasen besitzen lange Prodomänen, in denen Protein-Protein-Interaktionsmodule enthalten sind, die eine Bindung an ihre Regulatoren erlauben. Caspase-8 und -10 besitzen Death effector domains (DED), während Caspase-2 und -9 Caspase recruitment domains (CARD) besitzen (Hengartner 2000). Effektor Caspasen werden durch Initiator-Caspasen aktiviert und führen zu den apoptotischen Veränderungen der Zelle. Dieser Vorgang wird als Caspasen-Kaskade bezeichnet.

Caspasen schneiden ihre Substrate (wie zum Beispiel ICAD (Inhibitory Caspase-activated DNase), Laminin und Aktin) hinter der Aminosäure Aspartat, wodurch die Substrate inaktiviert oder aktiviert werden. Diese Vorgänge führen zu den morphologischen Besonderheiten der Apoptose wie der Karyopyknose, der Zellschrumpfung und der Abschnürung von Apoptosekörpern.

Caspasen liegen in der Zelle als inaktive Proformen, so genannte Procaspasen, vor. Diese bestehen aus drei Untereinheiten: einer N-terminalen Prodomäne, einer großen (p20) und einer kleinen (p10) Untereinheit (Hengartner 2000). Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung zwischen der p10 und p20

Untereinheit. Meist kommt es auch zur Abspaltung der Prodomäne. Die aktive Caspase ist ein Heterotetramer bestehend aus zwei p20 und zwei p10 Untereinheiten.

Der Schlüsselmediator der Apoptose ist Caspase-3. Für die Aktivierung der Caspase-3 gibt es zwei unterschiedliche Startpunkte. Sie kann durch die Bindung von Todesrezeptoren an der Plasmamembran (extrinsischer Signalweg), oder durch Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (intrinsischer Signalweg) initiiert werden. Beide Wege laufen in der Aktivierung von Caspase-3 zusammen (Hengartner 2000, Landgraeber et al. 2008). Aktivierte Caspase-3 aktiviert durch proteolytische Abspaltung der inhibitorischen Untereinheit CAD (Caspase-activated DNase), die in der Zelle als inaktiver Komplex (ICAD) existiert. Es kommt zum Abbau von Laminin und Aktin und zur Unterdrückung der DNA-Reparatur. Dadurch kommt es zur Kondensation des Zellkerns, zur Zellschrumpfung und zur Abschnürung der Zelle in kleinen Vesikeln (Hengartner 2000).

1.3.2 Extrinsischer Signalweg

Der extrinsische Signalweg wird über die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren initiiert. Todesrezeptoren kommen auf der Zelloberfläche vor und leiten Apoptosesignale wie den Verlust des Kontaktes zur Nachbarzelle oder einen irreparablen inneren Schaden weiter (Ashkenazi, Dixit 1998). Sie gehören zur Familie der TNF-Rezeptoren und besitzen eine homologe cytoplasmatische Sequenz, die Todesdomäne (Death domain, DD) (Gruss, Dower 1995). Zu den am Besten erforschten Todesrezeptoren gehören CD95 (auch Fas, oder Apo1) und TNFR1 (auch p55, oder CD122a). Die Liganden der Todesrezeptoren sind strukturell verwandte Moleküle der TNF-Gen-Familie. CD95 Ligand (CD95L) bindet an CD95 und TNF und Lymphotoxin α binden an TNFR1.

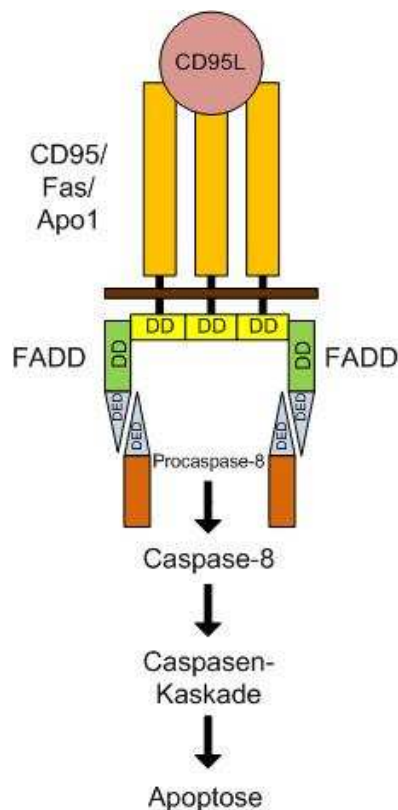
Der Signalweg über CD95 läuft wie folgt ab (Nagata 1997) (siehe Abbildung 1): CD95L bindet an drei CD95 Moleküle. Dadurch kommt es zur Clusterbildung der Todesdomänen von CD95. Das Adaptermolekül FADD (Fas-associated death domain) bindet mit der eigenen Todesdomäne an die Todesdomänen des Rezeptors. Außerdem enthält FADD eine Todes Effektor Domäne (DED). Diese

bindet an die DED der Procaspase-8. Es kommt zur Rekrutierung weiterer Moleküle Procaspase-8 und somit zu einer hohen lokalen Konzentration. Die niedrige intrinsische Proteaseaktivität der Procaspase-8 ist ausreichend, um zu einer autolytischen Aktivierung zu führen. Die aktivierte Caspase-8 initiiert die Caspasen-Kaskade.

Abbildung 1: Nach „Signalweg über CD95“ (Ashkenazi et al. 1998)

Durch die Bindung von CD95 Ligand (CD95L) an CD95 kommt es zur Clusterbildung der Todesdomänen (DD) von CD95. Über die Bindung von Fas-associated death domain (FADD) kommt es zur Rekrutierung von Procaspase-8 und zur Initiierung der Apoptose.

DED=Todes Effektor Domäne



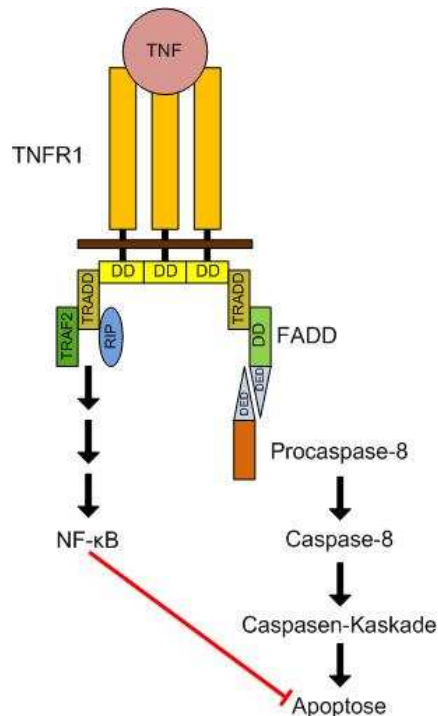
Im Rahmen des Signalwegs über TNFR1 bindet TNF an den Rezeptor (Ashkenazi, Dixit 1998) (siehe Abbildung 2). TNF wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und T-Zellen im Rahmen von inflammatorischen Prozessen produziert. Durch die Bindung kommt es auch hier zur Clusterbildung dreier Todesdomänen des TNFR1 Rezeptors. An diese bindet das Adaptermolekül TRADD (TNFR-associated death domain), wodurch es zur Rekrutierung mehrerer Signalmoleküle kommt. TRAF2 (TNFR-associated factor 2) und RIP (receptor interacting protein) stimulieren eine komplexe Kaskade, die zur Aktivierung des

Transkriptionsfaktors NF- κ B und somit zur Hemmung der Apoptose führt. FADD bindet an den TNFR1-TRADD-Komplex und an die DED der Procaspase-8. Es kommt wie im Signalweg über CD95 zur Aktivierung der Caspase-8, die Caspase-3 aktiviert.

Abbildung 2: Nach „Signalweg über TNFR1“ (Ashkenazi et al. 1998)

Durch die Bindung von Tumor Nekrose Faktor (TNF) an Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (TNFR1) kommt es zur Clusterbildung der Todesdomänen (DD) von TNFR1. Über die Bindung von Fas-associated death domain (FADD) kommt es zur Rekrutierung von Procaspase-8 und zur Initiierung der Caspasen-Kaskade. Des Weiteren kommt es durch die Stimulation einer komplexen Kaskade zur Hemmung der Apoptose.

DED=Todes Effektor Domäne, TRADD=TNFR-associated death domain, TRAF2=TNFR-associated factor 2, RIP=receptor interacting protein, NF- κ B=nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells



1.3.3 Intrinsischer Signalweg

Der intrinsische Signalweg wird durch irreparable Schädigung der DNA initiiert (siehe Abbildung 3). Als Antwort auf die DNA-Schädigung kommt es zum Konzentrationsanstieg des Transkriptionsfaktors p53 (Löffler, Petrides Biochemie und Pathobiochemie 2003). Dieser führt zur Aktivierung von Bax, einem pro-apoptotischen Protein aus der Bcl-2-Familie.

p53 ist ein nukleares Phosphoprotein, das als Transkriptionsfaktor fungiert, d. h. es ist ein Modulator, der entscheidende Gene an- und ausschalten kann (Nieder et al. 2001). Als Tumorsuppressorgen hemmt es die Zellvermehrung. Treten Schäden im Genom auf, inhibiert es die DNA-Replikation und greift in den Zellzyklus ein, indem es den Übergang von der G1- in die S-Phase hemmt. Besteht eine irreparable Schädigung, fungiert p53 als Initiator der Apoptose und verhindert so die weitere Zellvermehrung. Kommt es zu Veränderungen im p53-Gen, wie sie z.B. bei fast allen Tumoren zu finden sind, wird die fehlerhafte DNA weitergegeben und die Zelle entartet (Bühling et al. 2004).

Die homologen Proteine der Bcl-2-Familie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose (Nieder et al. 2001). Sie interagieren miteinander durch die Bildung von Homo- und Heterodimeren. Die Anfälligkeit einer Zelle für apoptotische Stimuli ergibt sich aus dem relativen Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie.

Bax bindet an der Mitochondrienmembran und wirkt dort der anti-apoptotischen Funktion von Bcl-2 entgegen (Hengartner 2000). Über noch nicht vollständig geklärte Mechanismen wird die Freisetzung von Cytochrom c und anderen pro-apoptotischen Faktoren, wie zum Beispiel Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP-binding protein with low pI) in das Cytoplasma gefördert.

Cytochrom c bindet im Cytosol an das Protein Apaf-1 (apoptotischer Protease Aktivierungsfaktor-1), wodurch es zu einer Konformationsänderung des Apaf-1 Proteins kommt und dessen Proteinbindungsdomäne (CARD) zugänglich wird. Procaspase-9 bindet mit seiner CARD an die Proteinbindungsdomäne von Apaf-1. Durch Assoziation der Proteine kommt es zur Bildung des aktivierten Caspase-9 Holoenzym, dem so genannten Apoptosom. Dieses aktiviert die Caspase-3, den Schlüsselmediator der Apoptose.

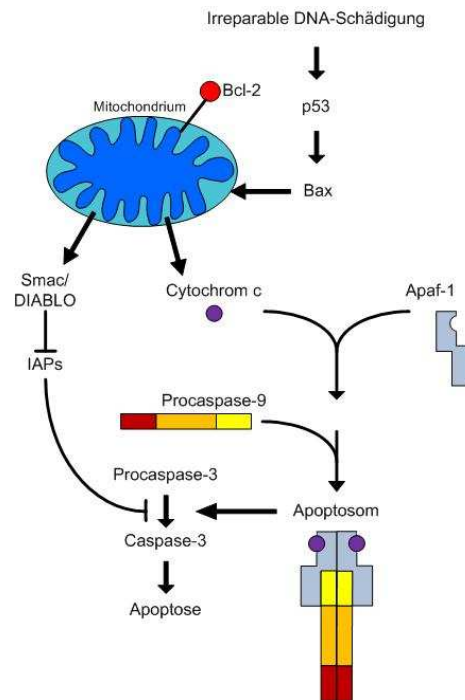
Smac/DIABLO wirkt pro-apoptotisch, indem es an IAPs (Inhibitors of apoptosis proteins), welche genetisch codiert werden, bindet und deren anti-apoptotische Aktivität neutralisiert.

Abbildung 3: Nach: „Mechanismus der Apoptose“ (Hengartner et al. 2000)

Durch eine irreparable DNA-Schädigung kommt es über den Transkriptionsfaktor p53 und Proteine aus der B-cell lymphoma (Bcl) -2-Familie zur Freisetzung verschiedener pro-apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien in das Cytoplasma.

Cytochrom c bindet an den apoptotischen Protease Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1), wodurch es zur Bildung des aktivierten Caspase-9 Holoenzym, dem Apoptosom, kommt. Dies initiiert durch die Aktivierung von Caspase-3 die Apoptose.

Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP-binding protein with low pI (Smac/DIABLO) neutralisiert die anti-apoptotische Wirkung von Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) und führt so zu einer Steigerung der Apoptose.



1.4 BOC-D-FMK

BOC-D-FMK (t-Butoxycarbonyl-Aspartat-Fluoromethyl-Keton) ist ein Caspase-Inhibitor, der irreversibel an das katalytische Zentrum der Caspasen bindet. Somit wird die initiale Spaltung der inaktiven Procaspase in die aktive Form blockiert. Dies hat zur Folge, dass die Caspasen-Kaskade, welche zur Apoptose der Zelle führt, gehemmt wird. BOC-D-FMK ist ein Breitspektrum Caspase-Inhibitor, der durch seine Struktur eine hohe Stabilität und Zellpermeabilität gewährleistet (Sheen-Chen et al. 2008). Unter anderem inhibiert er Caspase-3, den Schlüsselmediator der Apoptose.

Bereits in mehreren Studien wurde BOC-D-FMK als effektiver Inhibitor des Mechanismus des Apoptose eingesetzt. Gregoli et al. konnten in einem Modell zur Apoptose humaner Erythroid-colony-forming cells (ECFCs) durch Erythropoietin-

Deprivation zeigen, dass BOC-D-FMK durch die Blockade der Spaltung der Procaspase-3 eine Hemmung der Apoptose bewirkt. Neben einigen anderen getesteten Caspase-Inhibitoren erreichte BOC-D-FMK die effektivste Inhibition der Apoptose (Gregoli et al. 1999). Sheen-Chen et al. wiesen eine signifikante Verminderung der Apoptose hepatischer Zellen bei extrahepatischer Cholestase durch die Behandlung mit BOC-D-FMK nach (Sheen-Chen et al. 2008). Erst kürzlich setzten Kurosu et al. BOC-D-FMK als Caspase-3-Inhibitor in einer Studie zur Sorafenib induzierten Apoptose von BCR/ABL exprimierenden Zellen erfolgreich ein (Kurosu et al. 2009). In einer Studie zur TGF β induzierten Apoptose humaner B-Zellen konnten Schrantz et al. die Inhibition apoptotischer Merkmale, wie Zellschrumpfung, Phosphatidylserin-Expression auf der Zelloberfläche und die Kondensation des Zellkernes durch den Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-FMK nachweisen. Dieser gehört wie BOC-D-FMK zur Gruppe der Breitspektrum Caspase-Hemmer (Schrantz et al. 1999). In Modellen zur Partikel induzierten Osteolyse wurde BOC-D-FMK bislang nicht eingesetzt.

1.5 Mikro-CT

Die Mikro-Computertomographie (μ -CT) hat seit ihrer Beschreibung als Methode für die direkte Analyse von dreidimensionalen Knochenstrukturen 1989 durch Feldkamp et al. (Feldkamp et al. 1989) stark an Bedeutung zugenommen.

Seit der Einführung dieser Technologie führten technische Entwicklungen zur progressiven Verbesserung der Ortsauflösung und zur besseren Verfügbarkeit der Methode in der Forschung und in klinischen Laboratorien. Während zu Beginn eine Ortsauflösung von 70 μ m erreicht wurde, kann heute mit Auflösungen in der Größenordnung von 1 μ m gearbeitet werden (Jiang et al. 2002). Die höchsten Auflösungen werden mit Synchrotronstrahlungsquellen erreicht. Durch die Kombination von μ -CT und Röntgenmikroskopischen Technologien können Auflösungen im Submikron Bereich (0,6 μ m) erreicht werden (Takeuchi et al. 2002).

Während der ersten Studien lag der Fokus der 3-D Mikro-Computertomographie hauptsächlich auf den technischen und methodischen Aspekten des Systems (Müller et al. 1998). Rügsegger et al. betonten in einer späteren Studie die

praktischen Gesichtspunkte mikrotomographischer Bildgebung (Rüegsegger et al. 1996). In diesem Projekt stellten sie ein kompaktes, voll automatisiertes, mikrotomographisches System vor, das sich zur nicht-destruktiven Untersuchung von Knochenbiopsien unterschiedlicher Längen eignet. Um eine vollständige Standardisierung der Anwendungen dieser neuen Methode im Bereich der quantitativen 3-D Analyse des Knochens zu erreichen, wurden in vielen kürzlich veröffentlichten Studien die Ergebnisse der Mikro-Computertomographie mit Resultaten konventioneller histomorphometrischer Methoden verglichen (Müller et al. 1998, Uchiyama et al. 1997, Mitton et al. 1998, Cooper et al. 2004).

Die häufigste Anwendung des μ -CTs erfolgte bisher in der in vitro Quantifizierung osteoporotischer Veränderungen in trabekulären Knochenstrukturen (Borah et al. 2001). Wedemeyer et al. führten das μ -CT als neue Methode in der dreidimensionalen Analyse von Partikel induzierter Osteolyse im Tiermodell ein (Wedemeyer et al. 2007).

Die Mikro-Computertomographie ist ein nicht destruktives, schnelles und präzises Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der dreidimensionalen Knochenstruktur (Rüegsegger et al. 1996, Uchiyama et al. 1997). Durch den Erhalt der Einzelprobe sind im Anschluss weitere ergänzende Analysen wie die zweidimensionale Histomorphometrie möglich. Das Resultat des μ -CTs ist ein hochqualitatives Bild, dessen Speicherung in einem digitalen Datenformat die quantitative Analyse der dreidimensionalen Architektur erleichtert (Cooper et al. 2003).

1.6 Fragestellung der Arbeit

Die Rolle der Apoptose im pathophysiologischen Kontext der aseptischen Endoprothesenlockerung wird bisher kontrovers diskutiert. Während Huk et al., Zhang et al. und Catelas et al. (Huk et al. 2001, Zhang et al. 1999, Catelas et al. 1999) die Induktion der Apoptose als protektiven Faktor für die Entstehung von Osteolysen sehen, gehen Landgraeber et al. davon aus, dass die Apoptose die Entstehung von Osteolysen begünstigt (Landgraeber et al. 2006). Mit den bislang durchgeführten Studien war es nicht möglich einen kausalen Zusammenhang zwischen der Apoptose und der endoprothetischen Prothesenlockerung

herzustellen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu überprüfen, ob die apoptotische Reaktion die Osteolysenbildung und somit die aseptische Endoprothesenlockerung hemmen oder fördern kann.

Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Kann durch die medikamentöse Steuerung der Apoptose in den Makrophagen die Größe der Partikel induzierten Osteolysen beeinflusst werden?
2. Führt die Hemmung der Apoptose durch BOC-D-FMK zu einer Minderung der Osteolysen?

2 Material und Methoden

2.1 Tiermodell zur partikelinduzierten Osteolyse

2.1.1 Versuchsprinzip

28 gesunde 10-12 Wochen alte, männliche C57 BL/J7 Mäuse wurden randomisiert in 4 Gruppen mit jeweils 7 Tieren eingeteilt. Alle Tiere wurden einer Operation unterzogen, in der den Mäusen der Gruppen II und IV 30µl Polyethylen Partikel implantiert wurden und den Tieren der Gruppen I und III keine Partikel implantiert wurden. Die Tiere der Gruppen I und III dienten somit als Kontrollgruppen. Im Anschluss an die OP wurde den Tieren der Gruppen I und II in PBS-Puffer (Phosphate buffered saline = Phosphat-gepufferte Salzlösung) gelöstes DMSO (Dimethylsulfoxid) und den Tieren der Gruppen III und IV der in DMSO und PBS-Puffer gelöste Caspase-Inhibitor BOC-D-FMK intraperitoneal verabreicht. Nach 12-tägiger Versuchsdauer wurden die Tiere euthanasiert und ihnen anschließend per Orbitapunktion Blut für den TRAP-5b ELISA abgenommen. Anschließend wurde der Schädelknochen erst im µ-CT untersucht, danach histologisch aufbereitet und histomorphometrisch sowie immunhistochemisch untersucht.

2.1.2 Versuchstierhaltung

Die Versuchstierhaltung erfolgte standardisiert entsprechend den Richtlinien der Universität Duisburg-Essen und der Landesregierung von Nordrhein-Westfalen/Düsseldorf:

Tag-Nacht Rhythmus (12 Stunden hell/12 Stunden dunkel), Raumtemperatur 22±2°C, relative Luftfeuchtigkeit 55±5%, Luftumwälzung 15-fach pro Stunde.

Um das Risiko für Wundinfektionen und Verletzungen so gering wie möglich zu halten, wurden die Mäuse einzeln in Standardkäfigen für Nagetierhaltung (Makrolonkäfig Typ II) gehalten. Futter und Wasser wurden ad libidum zur Verfügung gestellt.

Für den Versuch lag ein genehmigter Antrag zur Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken (G 886/06) vom 10.07.2006 vor. Die Mäuse wurden vom zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen (Leiter: PD. Dr. G. Hilken) gestellt.

2.1.3 Tieranzahl

Die Anzahl der Tiere pro Gruppe wurde mittels einer Power Analyse des Departments Biostatistics der Mayo Clinic, Rochester, Minnesota auf 7 Tiere pro Gruppe festgelegt. Bei einem zweiseitigen Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ ergab sich eine Teststärke von 85% zur Ermittlung eines signifikanten Unterschieds zwischen den Gruppen.

2.1.4 Polyethylenpartikel

Für den Versuch wurden kommerziell erhältliche Polyethylenpartikel (Ceridust® VP 3610) von der Firma Clariant (Gersthofen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Laut Herstellerangaben waren 50% der Partikel kleiner als 5 μm und 90% kleiner als 9 μm .

Von größtem Interesse für das vorliegende Versuchsmodell sind Partikel mit einer Größe $< 1\mu\text{m}$, da diesen eine besondere Reaktivität in Bezug auf die partikelinduzierte Prothesenlockerung zugesprochen wird. Von Knoch et al. konnten mit Hilfe einer morphologischen Analyse dieser Polyethylenpartikel nachweisen, dass mehr als 35% der Partikel kleiner als 1 μm waren (von Knoch, M. et al. 2005). Die elektronenmikroskopisch bestimmte Partikelgröße (ECD) betrug $1,75 \mu\text{m} \pm 1,43 \mu\text{m}$ (Median 1,42 μm). Des Weiteren wurden die kommerziell erhältlichen Polyethylenpartikel mit Partikeln aus Hüftsimulator-experimenten verglichen, um die Eignung der Ceridustpartikel für in-vitro und in-vivo Experimente zu prüfen.

2.1.5 Polyethylenpartikelaufbereitung

Um eine Kontamination der Polyethylenpartikel durch Endotoxine zu beseitigen, wurden die Partikel zunächst mit Ethylenoxid sterilisiert. Dann wurden sie unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur in einer Laminar box im Schüttelbad mit 70% Ethylalkohol gewaschen. Nach 24 Stunden wurden die Partikel in einer Zentrifuge vom Alkohol getrennt. Anschließend wurde der beschriebene Waschschiworgang ein weiteres Mal durchgeführt und danach die Partikel im Desikator getrocknet. Abschließend wurden sie in einem endotoxinfreien Probenröhrchen (Firma Falcon, Franklin Lakes, USA) gelagert.

Limulus Amöbozyten Assay

Zur Quantifizierung von Endotoxinen in den Partikeln wurde ein Limulus Amöbozyten Assay (Charles River, Kent, England) durchgeführt. Dieser enthält ein Limulus Amöbozyten Lysat (LAL). LAL ist ein wässriges Extrakt, das aus den zirkulierenden Blutzellen (Amöbozyten) von Pfeilschwanzkrebsen (Limulus polyphemus) gewonnen wird. Das LAL wird beim Vorhandensein von gramnegativen bakteriellen Endotoxinen trüb und bildet durch die Gerinnung ein festes Gel (Gel Clot).

Das biologische Prinzip dieses Testes wurde in den fünfziger Jahren von F. Bang entdeckt. Er beobachtete eine durch gramnegative Bakterien verursachte Koagulation des Limulus Blutes. Gemeinsam mit F.B. Levin fand er heraus, dass es sich um eine enzymatische Reaktion handelt, welche durch Enzyme in den Amöbozyten der Pfeilschwanzkrebse bedingt wird. Ausgelöst wird die Gerinnung durch das Endotoxin, welches eine strukturelle Komponente der Bakterienzellwand darstellt. Es kommt zum Ablauf einer nicht vollständig erforschten Gerinnungskaskade, in deren letztem Schritt das Gerinnungsprotein Koagulogen gespalten wird. Die unlöslichen Spaltprodukte vereinigen sich durch ionische Wechselwirkungen und es entsteht eine Gel-Matrix (Levin, Bang 1968).

Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurde bei der Durchführung des Testes mit pyrogenfreien Pipettenspitzen, Pipetten und Röhrchen gearbeitet. Für die benötigten Verdünnungen und die Negativkontrolle wurde endotoxinfreies

destilliertes Wasser verwendet (Endosafe Limited Charles River, Endosafe Tubes (13x100mm) Depyrogenated Tubes Testes to <0,001 EU/ml, Kent, England).

Zunächst wurde der Endotoxin-Standard auf Raumtemperatur erwärmt, mit dem Vortexer gemischt und in die endotoxinfreien Röhrchen pipettiert.

Dann wurde eine Verdünnungsreihe des Endotoxin-Standards angesetzt:

Im ersten Arbeitsschritt wurde eine Verdünnung hergestellt, die einer Konzentration von 10 EU/ml entsprach.

Hier: 0,5 ml aus Standard mit 3,5 ml Aqua dest. = 10 EU/ml (1:8).

Aus dieser Verdünnung wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt, sodass die Gerbrauchsverdünnung in einer Konzentration von 1 EU/ml vorlag.

Hier: 250 µl aus Standard I mit 2,5 ml Aqua dest. = 1 EU/ml (1:10)

Im zweiten Arbeitsschritt wurden die LAL Röhrchen gefüllt:

- (1) Negativkontrolle = 1 Röhrchen mit 200 µl Aqua dest.
- (2) Positivkontrolle = 1 Röhrchen mit 100 µl Aqua dest.+100 µl Standard I
- (3) Proben
 - 1. Röhrchen mit 200 µl Probe
 - 2. Röhrchen mit 100 µl Probe + 100 µl Standard I (diente als Produktkontrolle zum Nachweis eventuell vorhandener Hemmstoffe)

Die Kontrollen und Proben wurden bei 37° Celsius inkubiert und dann abgelesen. In den Polyethylenpartikeln konnten keine Endotoxine nachgewiesen werden. Die PEP Probe fiel im Vergleich mit der Negativ- und Positivkontrolle eindeutig negativ aus.

PEP Probe	Negativkontrolle	Positivkontrolle
Negativ (-) [flüssig]	Negativ (-) [flüssig]	Positiv (+) [geliert]

2.2 BOC-D-FMK

BOC-D-FMK (Imgenex, San Diego, CA, USA) ist ein Breitspektrum Caspase-Inhibitor, welcher irreversibel an das katalytische Zentrum der Caspase Protease bindet. Dadurch wird die Umwandlung der Procaspase in die aktive Form verhindert und somit die Apoptose gehemmt. BOC-D-FMK enthält eine O-

Methylgruppe in P-Position, wodurch eine höhere Stabilität und bessere Zellpermeabilität erreicht wird.

BOC-D-FMK wird chemisch als t-Butoxycarbonyl-Aspartat-Fluoromethyl-Keton bezeichnet. Die Summenformel von BOC-D-FMK lautet $C_{11} H_{18} NO_5$ und das molekulare Gewicht beträgt 263.

2.3 Partikelimplantation

2.3.1 Narkose und OP Vorbereitung

Die Mäuse wurden mit einer intraperitonealen Injektion aus 5-7mg/kg Körpergewicht Xylazin (CEVA Sante animale, Xylanzinhydrochlorid, Düsseldorf, Deutschland) und 70-80mg/kg Körpergewicht Ketamin (CEVA Sante animale, Ketaminhydrochlorid, Düsseldorf, Deutschland) in Natriumchloridlösung anästhesiert.

Bei allen Versuchstieren wurde das Operationsgebiet rasiert und mit Cutasept F (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) dreimal desinfiziert. Die Augen wurden mit Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen, Deutschland) vor Austrocknung und Eindringen von Fremdkörpern, wie zum Beispiel Haaren, geschützt. Die Versuchstiere wurden zum Erhalten der Körpertemperatur auf eine Wärmeplatte mit 37°C gelegt.

2.3.2 Durchführung der Operation

Die Operationen wurden in allen Gruppen unter gleichen Bedingungen vormittags durchgeführt.

Es wurden Einmalskalpelle (Surgical Disposable Scalpel, Braun, Tuttlingen, Deutschland), sterile Einmaloperationshandschuhe (Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland), sterile Pinzetten, scharfe Löffel und Scheren (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) verwendet.

Die Kopfhaut wurde mit einem ca. 10mm langen Schnitt, beginnend vor der Verbindungslinie der äußeren Ohren, längs der Mittellinie eröffnet. Auf einer

Fläche von 1,0cm x 1,0cm wurde stumpf das Periost dargestellt, ohne dieses zu verletzen.

Bei den Mäusen der Gruppen II und IV wurden 30µl Polyethylenpartikel mittels eines scharfen Löffels auf das Periost aufgebracht und gleichmäßig verteilt. In den Gruppen I und III wurde die Operation ohne die Implantation der Partikel durchgeführt.

Die Haut wurde mit monofilem 5-0 Prolene Nahtmaterial (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) genäht.

Im Anschluss an die Operation wurden die Tiere wieder auf die Wärmeplatte gelegt und nach dem Abklingen der Narkose in ihre Käfige zurückgesetzt.

2.3.3 Applikation der Medikamente

Den Tieren der Gruppen I und II wurde direkt postoperativ 30µl in 70µl PBS-Puffer gelöstes DMSO intraperitoneal injiziert.

Den Tieren der Gruppen III und IV wurde direkt postoperativ BOC-D-FMK in einer Dosierung von 3mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Dazu wurde 1mg BOC-D-FMK (Imgenex, San Diego, CA, USA) in 381µl DMSO gelöst und mit 889µl PBS-Puffer verdünnt, um eine Peritonitis bei den Mäusen zu verhindern. Jeweils 100µl der fertigen Lösung wurden dann appliziert.

Die intraperitoneale Gabe der genannten Medikamente wurde über die 12-tägige Versuchsdauer täglich morgens wiederholt.

2.3.4 Visiten

Bei den täglich durchgeführten Visiten wurden das Verhalten, der Allgemeinzustand und der Ernährungszustand der Mäuse beurteilt. Die Operationswunde wurde auf Wundheilungsstörungen, Blutungen oder Infektionen untersucht. An den Injektionsstellen wurde auf Infektionen geachtet.

2.3.5 Euthanasierung der Versuchstiere

Am 12. postoperativen Tag wurden die Tiere aller vier Gruppen euthanasiert. Dazu wurden sie mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran (Forene®, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) betäubt und mittels cervicaler Dislokation getötet. Im direkten Anschluss erfolgte die orbitale Blutentnahme.

2.4 Präparation der Schädelknochen

Zur Präparation der Schädelknochen wurde das Fell der Maus im Nackenbereich mittels einer spitzen Schere inzidiert. Von hier ausgehend wurden das Fell und das Unterhautfettgewebe zirkulär um den Hals eingeschnitten und stumpf von der Unterlage getrennt. Anschließend wurde das Fell vom Unterkiefer gelöst und entfernt. Mit dem Finger wurde der Übergang von Occiput zur Halswirbelsäule aufgesucht und deutlich dargestellt. Mit einer Schere wurden Wirbelsäule, Muskulatur und Halsweichteile durchtrennt. Um das Operationsgebiet mit dem Granulationsgewebe und möglicher partikelinduzierter Osteolyse zu schonen, wurde zunächst das Kopffell zum Schutz belassen. Durch Auseinanderdrängen der Kaumuskulatur wurden die beiden Processus mandibulares dargestellt und durchtrennt. So konnten der Unterkiefer, die Zunge, die Pharynxmuskulatur und Halsweichteile entfernt werden. Zuletzt wurde vorsichtig das Kopffell vom restlichen Schädel abpräpariert und die Muskulatur abgetragen, ohne dabei die knöchernen Strukturen zu schädigen. Die Schädelknochen wurden sofort mittels μ -CT untersucht.

2.5 Präparation der Calvaria

Um die Calvaria, die sich aus dem Os frontale, den Ossa parietalia und dem Os occipitale zusammensetzt, zu präparieren, musste zunächst die Schädelbasis entfernt werden. Ausgehend vom Foramen magnum wurde die Schädelbasis in der Medianlinie bis zum harten Gaumen mit einer spitzen Schere durchtrennt. Auf jeder Seite wurde ein weiterer Schnitt vom Foramen magnum zum Meatus acusticus externus durchgeführt, wodurch die Schädelbasis von den Ossa

parietalia getrennt wurde. Nachdem auch die Jochbögen am Ansatz abgesetzt worden waren, konnte die Schädelbasis mit der Pinzette in zwei Teilen abgehoben werden. Das jetzt sichtbare Hirngewebe und der Gesichtsschädel wurden vorsichtig entfernt. Die präparierte Calvaria wurde in Formalin gelegt und für die histologischen Untersuchungen aufbereitet.

2.6 Histologische Aufbereitung

Die präparierten Schädelkalotten wurden für 12 Stunden in einer neutralen EDTA Lösung in einem Ultraschall-Entkalkungsbad (Medite USE 33, MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland) behandelt. Die entkalkten Schädelknochen wurden in Paraffin gebettet und über dem Operationsgebiet in der Frontalebene geschnitten. Die 4 µm dicken Schnitte wurden auf Objektträger gezogen. Neben einer Hämatoxylin Eosin (HE) Färbung wurde eine immunhistochemische Caspase-3-cleaved-Färbung durchgeführt (siehe Anhang 7.2).

2.6.1 Hämatoxylin Eosin (HE) Färbung

Die angefertigten Knochenschnitte wurden zunächst entparaffinisiert und rehydriert. Im Folgenden wurden sie im Färbeautomaten (Shandon Varistain Gemini, Thermo Electron Corporation, Basingstoke, England) standardisiert 3 min in Mayers Hämalaun Lösung (Merck 109249, Darmstadt, Deutschland) und anschließend 3-5 min in Erythrosin B-Lösung (Merck 115936, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Der gefärbte Schnitt wurde mit Wasser und Xylol gespült und anschließend eingedeckt (siehe Anhang 7.2).

2.7 Immunhistochemie

2.7.1 Caspase-3-cleaved-Färbung

Caspase-3-cleaved ist die aktivierte Form der Caspase-3 und gilt als spezifische Kennziffer für apoptotische Zellen. Procaspase-3 wird in apoptotischen Zellen in zwei Fragmente gespalten. Der Antikörper erkennt ein bei der Spaltung neu entstandenes Epitop des größeren Fragmentes und bindet daran. Er reagiert

weder mit Procaspase-3 noch mit einer anderen Caspase und ist deshalb eine spezifische Kennziffer für die aktivierte Caspase-3. Somit ist das Ergebnis nur in apoptotischen Zellen mit aktivierter Caspase-3 positiv und ist ein spezifischer Apoptosenachweis.

Es wurden zunächst 2-4µm dicke Knochenschnitte hergestellt, die dann in Xylol entparaffinisiert und anschließend in einer Alkoholreihe rehydratisiert wurden. Endogene Peroxidase im Knochenschnitt wurde durch Peroxidblock (3% H₂O₂-Lösung) inaktiviert, um unerwünschte Hintergrundfärbung zu vermeiden. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper gegen Caspase-3-cleaved (Polyklonaler Antikörper, Verdünnung 1:200, Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) für 30 min in einem automatischen Autostainer (Autostainer, Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark) inkubiert. Dann wurde das HRP (Horse Radish Peroxidase)-Polymer (Zytomed POLHRP-100, Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) aufgetragen, in dem mehrere Moleküle Sekundärantikörper mit mehreren Molekülen Meerrettich-Peroxidase (HRP) kovalent verbunden sind. Die Präparate wurden 30 min inkubiert. Durch die Zugabe einer Substrat-Chromogenlösung wurde eine enzymatische Reaktion mit der Peroxidase gestartet. An der Bindung mit dem Primärantikörper bildete sich ein brauner Farbniederschlag. Die Farbreaktion wurde mit destilliertem Wasser gestoppt (Färbeprotokoll siehe Anhang 7.2). Als Positivkontrolle für Caspase-3-cleaved diente Thymusgewebe von Mäusen. Vor der lichtmikroskopischen Analyse wurden die Präparate codiert und geblindet und anschließend aufgrund der fachlichen histomorphometrischen Kenntnisse in Kooperation mit Herrn Dr. Landgraeber, Institut für Orthopädie, Universitätsklinikum Essen und Herrn PD Dr. Tötsch, Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen beurteilt. Es wurden Markophagen, Osteoklasten und Osteoblasten nach histologischen Kriterien identifiziert. Im Zweifelsfall wurden die Präparate immunhistochemisch gefärbt, um Makrophagen (CD68), Osteoklasten (TRAP), oder Osteoblasten (Osteocalcin) zu identifizieren. Die Präparate wurden nach der Anwesenheit von Caspase-3-cleaved in den verschiedenen Zellen anhand der Farbtintensität bewertet. Die Osteoklasten wurden pro Gesichtsfeld gezählt.

2.8 Auswertung der histologischen Präparate

2.8.1 Bildanalyzesystem

Mit dem Lichtmikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) wurden die gewünschten Gesichtsfeldausschnitte der gefärbten Präparate mit 20-, 40-, 100-, oder 200-facher Vergrößerung eingestellt. Die auf dem Mikroskop montierte Kamera Nikon CCD-1300 (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) übertrug die Bilder auf den angeschlossenen Computer. Die Bildanalyse erfolgte mittels des Computerprogramms NIS Elements AR 3.0 (Nikon, Düsseldorf, Deutschland), das unter zu Hilfenahme eines Messmikrometers geeicht wurde. Mit Hilfe verschiedener Messgitter und Funktionen konnten die im Folgenden beschriebenen histomorphometrischen Parameter ermittelt werden.

2.8.2 Qualitative Beschreibung

Die Präparate wurden zunächst qualitativ unter Berücksichtigung aller Schnitte beurteilt. Hierzu wurden sie lichtmikroskopisch bei 20-, 40-, und 100-facher Vergrößerung betrachtet. In den Übersichtsvergrößerungen wurden der erste Eindruck des Präparates, eventuelle Schädigungen bei der Herstellung des Präparates und die Verteilung der verschiedenen Gewebearten beurteilt. Es wurde eine grobe Einschätzung der Schnitthöhe vorgenommen. In der höheren Vergrößerung wurden die unterschiedlichen Gewebearten, die Ausdehnung der Mittelliniensuturfläche und vorhandene Zelltypen erfasst.

2.8.3 Quantitative Beschreibung

Zur quantitativen Beurteilung des osteolytischen Geschehens in den verschiedenen Gruppen wurden Gewebestrukturen ausgemessen, die Rückschlüsse auf das Ausmaß der Knochenresorption zulassen.

Um ein standardisiertes Vorgehen und benutzerunabhängige Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die Mittelliniensutur im Gesichtsfeld zentriert und das

beurteilte Gesamtgewebe, die Mittelliniensuturfläche und die Osteolysen außerhalb der Mittelliniensutur bestimmt. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen wurden ausgewertet und für jedes Tier sowie in jeder Gruppe gemittelt.

Im Folgenden werden die Parameter der quantitativen Auswertung vorgestellt:

Mittelliniensuturfläche

Die Mittelliniensuturfläche stellt die bindegewebige Verbindung der beiden Parietalknochen dar. Sie gilt als Indikator für die osteolytische Aktivität (Schwarz et al. 2000). Die Mittelliniensuturfläche wurde mit 100-facher Vergrößerung im Gesichtsfeld zentriert und ausgemessen. Sie wurde in mm² angegeben (siehe Anhang 7.1 Abbildung 5 - Abbildung 8).

Osteolysen

Die außerhalb der Mittelliniensuturfläche entstandenen Osteolysen wurden bei 100-facher Vergrößerung rechts und links der Suture gemessen. Sie wurden in mm² angegeben.

Gesamtgewebe

Das Gesamtgewebe beinhaltet die Fläche des Knochengewebes, der Mittelliniensutur und der Osteolysen. Es wurde mit 20-facher Vergrößerung im Gesichtsfeld eingestellt und in mm² angegeben. Die so gemessene Fläche stellt die Gesamtmessfeldfläche dar (siehe Anhang 7.1 Abbildung 9 - Abbildung 12).

Gewebeverteilung

Die Gewebeverteilung gibt Auskunft über den Anteil der unterschiedlichen histologischen Gewebearten am gemessenen Gesamtgewebe.

Die Gewebearten Osteolysen und Mittelliniensuturfläche wurden im Vorfeld als absolute Flächen bestimmt. Diese wurden zu der Gesamtfläche ins Verhältnis gesetzt und ergeben so den prozentualen Anteil. Dadurch sind die Ergebnisse zwischen den einzelnen Gruppen vergleichbar.

2.9 Mikro-CT

Für die qualitative und quantitative Analyse der Mäuseschädel wurde ein X-Ray Microtomograph 1072 (Skyscan, Aartselaar, Belgien) verwendet, der von der Abteilung für Kardiologie (Leiter: Herr Prof. Dr. med. R. Erbel) des Westdeutschen Herzzentrums der Universität Duisburg-Essen zur Verfügung gestellt wurde.

Der größte Unterschied zwischen in der Klinik verwendeten Ganzkörper-Spiral-CT- und Mikro-CT-Geräten liegt in der Ortsauflösung der resultierenden Bildern. Während mit klinischen CT-Geräten Ortsauflösungen von circa 1mm erreicht werden, werden im Mikro-CT Auflösungen zwischen 5 und 50µm erreicht. Auch die Schichtdicken variieren zwischen den beiden Methoden. Im Mikro-CT werden Schichtdicken von 5µm erreicht, während sie im Ganzkörper-Spiral-CT bei 0,5-2mm liegen (Engelke et al. 1999).

Das Mikro-CT besteht aus einem Röntgen-Mikroskop-System, einer PC-Einheit zur Gerätesteuerung und einem computerunterstützten Rekonstruktionsprogramm. Es wird eine Mikrofokusröhre mit einer Ortsauflösung von 8µm und einer erwarteten Lebensdauer von >10000 Stunden verwendet. Die Röntgenröhre arbeitet mit einer elektrischen Spannung zwischen 20kV und 80kV und mit einer Stromstärke von 0-100µA. Für das Digitalisieren der Schädelknochen wurden in dieser Studie eine Spannung von 80kV und eine Stromstärke von 100µA benutzt.

Die präparierten Schädelknochen wurden zwischen der Mikrofokusröntgenquelle und einem Charged-Coupled-Device (CCD)-Detector (Bildmatrix: 1024x1024 Pixel, Bildausschnitt (field of view (FOV)): 25mm²) auf einem computergesteuerten Objektschlitten positioniert und mit einer 19,23-fachen Vergrößerung digitalisiert. Um die Schädelknochen während des Digitalisierungsvorgangs zu fixieren, wurden sie in einer engen Kunststoffröhre platziert und mit Knetmasse auf dem Objektschlitten angebracht. Der Objektschlitten kann Rotationsbewegungen in frei definierbaren Winkelschritten durchführen und entlang der Längsachse bewegt werden. Der hier gewählte Rotationswinkel betrug 0,9° bei einer Drehung von 180° und einer Belichtungszeit von 4,9 Sekunden. In den Rekonstruktionseinstellungen wurde ein Schwellenwert von 20% gewählt.

Nach der Erstellung eines Übersichtsbildes (siehe Anhang 7.1 Abbildung 13), das zur Überprüfung der Positionierung des Präparates diente, wurden so pro Präparat 200 2-dimensionale Bilder erzeugt, die mit Hilfe des zugehörigen

Computerprogramms dargestellt, kontrolliert und als 16bit TIF Dateien gespeichert wurden.

2.9.1 Prinzip der Mikrotomographie

Jedes Röntgenbild ist eine 2-dimensionale Projektion eines 3-dimensionalen Objekts. Im einfachsten Fall handelt es sich um parallele Röntgenstrahlen. Bei dieser Annahme setzt sich jeder Punkt des Röntgenbildes aus allen Absorptionen innerhalb des 3-dimensionalen Objektes im jeweiligen Röntgenstrahl zusammen. Indem das Objekt um seine eigene Achse rotiert, kann im parallelen Strahlengang eine Serie 2-dimensionaler Schichten eines Objektes aus Schattenlinien berechnet werden. Je geringer der jeweilige Rotationswinkel ist, desto genauer kann die Lokalisation einzelner Absorptionen berechnet werden. Diese Methode wird als Rückprojektion bezeichnet. Im Rahmen dieses Vorgangs kommt es dazu, dass das Gebiet um einen definierten Punkt herum unscharf wird. Um dies zu korrigieren, wird in diesem Bereich negative Absorption zu den berechneten Werten addiert. Dieser Vorgang wird als Konvolution bezeichnet. So wird ein Bild erzeugt, das dem realen Bild besser entspricht (SkyScan 1072 X-Ray Microscope – Microtomograph Instruction manual, 1998-2001, Version 3, Aartselaar, Belgien).

2.9.2 Rekonstruktion der Mikro-CT-Bilder

Die digitalisierten Röntgenbilder der Schädelknochen wurden mit dem Rekonstruktionsprogramm Cone Beam Reconstruction (SkyScan, Aartselaar, Belgien) bearbeitet. Die Rekonstruktion ermöglicht eine anschließende Analyse der Bilder. Durch Anwendung des Feldkamp Rekonstruktions-Algorithmus wurde eine Tabelle erstellt, in der die Absorptionswerte eines 2-dimensionalen Querschnitts durch den digitalisierten Knochen enthalten waren. Diese Tabelle wurde durch Umrechnung der Absorptionswerte in Graustufen in ein Querschnittsbild umgewandelt. Es wurden ein minimaler und ein maximaler Wert ausgewählt (Hier: 0,308...0,522), wodurch im Bild alle Werte, die kleiner als der minimale Wert waren weiß und alle Werte, die größer als der maximale Wert waren schwarz erschienen. Alle im ausgewählten Bereich liegenden Werte

wurden in ein Bild mit 256 ineinander übergehenden Graustufen konvertiert. Von jedem Präparat wurde der Bereich der Mittelliniensutur als Querschnitt dargestellt. Um die einzelnen Objekte aneinander anzugleichen, wurde mit einer Kompensierung von 1 Pixel gearbeitet und die Ausrichtung der einzelnen Präparate wurde angepasst (siehe Anhang 7.1 Abbildung 14).

2.9.3 Analyse

Die quantitative Analyse wurde mit dem Programm CT-Analyse (Skyscan, Aartselaar, Belgien) durchgeführt. Aus dem Datensatz der zuvor rekonstruierten Querschnittsbilder wurde ein Schnitt ausgewählt, der sich im Bereich der partikelinduzierten Osteolyse bzw. im Operationsgebiet befand. An diesem Schnitt wurde eine „Region of interest“ (ROI) von ca. 2x2mm festgelegt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Mittelliniensutur im Zentrum zu liegen kam (siehe Anhang 7.1 Abbildung 15). Im nächsten Schritt wurden 100 ROIs miteinander verbunden und so ein „Volume of interest“ (VOI) von etwa 2x2x2mm erzeugt. Dadurch wurde eine quantitative 3-dimensionale Analyse ermöglicht (siehe Anhang 7.1 Abbildung 16 - Abbildung 19). Mittels des Analyse-Programms wurden das Knochenvolumen BV (bone volume) und das Relative Knochenvolumen BV/TV (Bone density) bestimmt.

2.10 *MouseTRAP 5b Assay*

Aktivierte Osteoklasten und Makrophagen setzen große Mengen an Tartrat-resistenter saurer Phosphatase („tartrate-resistant acid phosphatase“, TRAP) frei. Im Blut kommen zwei unterschiedliche Formen, TRAP 5a und TRAP 5b, vor. TRAP 5b wird von aktivierten Osteoklasten als aktives Enzym sezerniert, dann im Blutkreislauf inaktiviert und abgebaut. TRAP 5b weist im Serum nur eine geringe Variabilität auf und eignet sich deshalb als Kennziffer für die Anzahl der Osteoklasten im Blut.

2.10.1 Versuchsprinzip

Der Mouse TRAP 5b Assay (Immunodiagnostic Systems Inc., Fountain Hills, USA) funktioniert nach dem Prinzip eines ELISAs. In die mit polyklonalem Anti-rabbit IgG beschichteten Mulden der Mikrotiterplatte wird Anti-Maus TRAP Antikörper zugegeben. Werden Proben, Kontrollen und Standards zugefügt, bindet der polyklonale Antikörper an die im zugegebenen Material vorhandene TRAP. Nach einer Inkubationszeit wird ungebundenes Material in einem Waschvorgang entfernt. Durch die Zugabe von pNPP (para-Nitrophenyl-Phosphat) Substrat wird eine Farbentwicklung hervorgerufen, die durch die Stopp-Lösung beendet wird. Die resultierende Färbung ist direkt proportional zu der Konzentration und der Aktivität von TRAP 5b in der Probe.

2.10.2 Durchführung

Die Blutproben wurden zur Abtrennung der Zellen vom Serum in einer Zentrifuge mit 2000rpm für 4 Minuten zentrifugiert. In jede antikörperbeschichtete Mulde einer Mikrotiterplatte wurden zunächst 100µl des Anti-Maus TRAP Antikörpers gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 60 Minuten bei 20-24°C auf dem Schüttler bei 950U/min inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der Mulden verworfen und jede Mulde viermal mit 250µl verdünnter Waschlösung (Tris-buffered saline (TBS) mit Tween 20) gewaschen. Hier: 40ml konzentrierte Waschlösung + 960ml destilliertes Wasser. Dabei wurde darauf geachtet, Kreuzkontaminationen zwischen den einzelnen Mulden zu vermeiden. Im Doppelansatz wurden nun 100µl der Kalibratoren und Kontrollen und 25µl des gewonnen Serums zusammen mit 75µl 0,9% NaCl in jeweils eine Mulde pipettiert. Zu jeder Mulde wurden 25µl Releasing-Reagent zugegeben. Die Platte wurde wieder 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Waschschrift wiederholt. Pro Mulde wurden 25µl pNPP Substrat, ein chromogenes Substrat für alkalische und saure Phosphatase-Analysen pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde mit Folie abgedeckt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. In jede Mulde wurden 50µl einer Stopp-Lösung (0,32M Natriumhydroxid) zugegeben, die Mikrotiterplatte wurde 5-10 Sekunden vorsichtig geschüttelt und vor dem Ablesen 5 Minuten stehen gelassen. Die Absorption wurde mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge

von 450nm bestimmt. Zur Ermittlung der Ergebnisse wurden die durchschnittlichen Absorptionen jedes Kalibrators auf der Ordinate gegen die Konzentration auf der Abszisse in einem log-lin Graphen aufgetragen. Mit Hilfe dieser Kurve konnten die Werte der Kontrollen und Proben in U/I bestimmt werden. Für die Bestimmung der endgültigen Werte mussten die Ergebnisse der Proben mit dem Verdünnungsfaktor (hier 1:4) multipliziert werden.

2.11 Statistik

Um die Normalverteilung der ermittelten Parameter zu bestimmen ($p \leq 0.05 \Rightarrow$ nicht normal verteilt), wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet. Die normal verteilten Daten wurden mit dem Student's t-test und die nicht normal verteilten Daten mit dem u-Test getestet. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet, ein p-Wert von $<0,001$ als hoch signifikant. Für die statistische Berechnung wurde die Software SPSS 12.0 (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, Illinois, USA) benutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Tägliche postoperative Visiten

Bei den täglichen postoperativen Visiten präsentierten sich die Tiere in gutem Allgemein- und Ernährungszustand. Die Operationswunden zeigten sich reizlos, es traten keine Wundheilungsstörungen auf. Die Augen waren gut befeuchtet und zeigten keine Zeichen einer Infektion. Die Wasser- und Futteraufnahme war gut, es wurde keine Gewichtsabnahme verzeichnet. Es kam zu keinen Ausfällen oder Erkrankungen. Kein Tier verstarb vorzeitig. Die Fäden wurden über die Versuchszeit in situ belassen, um die Tiere keinem zusätzlichen Stress auszusetzen.

3.2 Qualitative histologische Analyse der Knochenschnitte

In der Übersichtsvergrößerung stellte sich der Mäuseschädel als gebogener Streifen Knochengewebe dar. Er ließ sich in zwei Hälften unterteilen, die durch die bindegewebige Mittelliniensutur verbunden waren. Im Querschnitt konnte man den dreischichtigen Aufbau des Knochens erkennen. Außen die Substantia compacta lamina externa (Außenkortikalis), in der Mitte die Diploë (Spongiosa) und innen die Substantia compacta lamina interna (Innenkortikalis). Außen- und Innenkortikalis waren von Periost überzogen, während die Oberflächen von Hohlräumen innerhalb des Knochens mit Endost ausgekleidet waren. In der spongiösen Schicht waren Markräume und Blutgefäße erkennbar. Der Knochen enthielt Osteozyten, die von mineralisierter Knochenmatrix umgeben waren.

Dem Knochen aufgelagert fand sich, in Folge der Kopfhauteröffnung, in allen Gruppen fibrinöses und granulomatöses Narbengewebe.

3.2.1 Gruppe I (Keine Partikelimplantation, Applikation von DMSO)

Die Präparate der Gruppe I zeigten eine ebene Oberfläche mit nur vereinzelten Osteolysen auf beiden Seiten der Mittelliniensutur. Das Periost war

intakt. Die Mittelliniensutur war nur in einzelnen Präparaten vergrößert und war mit kollagenreichem Bindegewebe gefüllt. Die Kollagenfasern des Bindegewebes zeigten einen geordneten Verlauf. Es waren nur wenige Makrophagen, Osteoblasten und Osteoklasten nachweisbar. Das Narbengewebe war in dieser Gruppe nur gering ausgeprägt und nicht entzündlich infiltriert.

3.2.2 Gruppe II (Partikelimplantation, Applikation von DMSO)

In den Präparaten der Gruppe II war die Knochenoberfläche sehr unregelmäßig und zeigte ein unstrukturiertes Bild. Rechts und links der Mittelliniensutur waren viele zum Teil große Osteolysen zu sehen. Das Periost war nicht mehr intakt. Die Mittelliniensuturfläche stellte sich in allen Schnitten vergrößert dar. In einigen Präparaten kam es zum Einbruch der Markräume in das Bindegewebe der Mittelliniensuturfläche. Es war eine große Anzahl von Makrophagen nachweisbar, besonders in der Nähe der Partikel. Hier präsentierten sie sich mit aufgeschwemmtem Zytoplasma, was charakteristisch für schaumzellartige Makrophagen ist. Es waren außerdem viele Osteoklasten vorhanden. Das Narbengewebe war stark ausgeprägt und zeigte viele Entzündungszellen. In einigen Präparaten hatten sich Nekrosen gebildet.

3.2.3 Gruppe III (Keine Partikelimplantation, Applikation von BOC-D-FMK)

Die Präparate der Gruppe III präsentierten sich ähnlich denen aus Gruppe I. Die Knochenoberfläche war glatt konturiert, das Periost war intakt. Es waren wenig Osteolysen vorhanden. Makrophagen und Osteoklasten kamen in geringer Anzahl vor. Die Mittelliniensuturfläche war nur gering vergrößert. Auch das Narbengewebe war hier nur schwach ausgebildet.

3.2.4 Gruppe IV (Partikelimplantation, Applikation von BOC-D-FMK)

Im Vergleich zu Gruppe II präsentieren sich die Knochenschnitte deutlich solider und strukturierter. Das Periost war weitgehend erhalten. Die Mittelliniensuturfläche

war vergrößert, aber deutlich kleiner als in Gruppe II. Es zeigte sich im Vergleich zu Gruppe II eine geringere Anzahl von Osteolysen, im Vergleich zu Gruppe I und III war die Anzahl jedoch erhöht. Die vorhandenen Makrophagen wiesen eine normale Morphologie auf und waren in großer Anzahl in der Nähe der Partikel nachweisbar. Im Vergleich zu Gruppe II konnten deutlich weniger Osteoklasten nachgewiesen werden. Auch in dieser Gruppe zeigte sich ein ausgeprägtes, entzündlich infiltriertes Narbengewebe mit vereinzelt Nekrosen. Des Weiteren konnte in einigen Präparaten Knochenneubildung beobachtet werden. Das osteoide Gewebe fand sich zu beiden Seiten der Mittellinie dem soliden Knochen aufgelagert. In ihm waren viele Osteozyten, Osteoblasten, Kapillarendothelzellen und Erythrozyten enthalten.

3.3 Quantitative histologische Analyse der Knochenschnitte

3.3.1 Mittelliniensuturfläche

Die Auswertung der Messergebnisse der Mittelliniensuturfläche ergab die nachfolgend beschriebene Verteilung (siehe Anhang 7.3 Tabelle 2).

In der Gruppe I (keine Partikel, Applikation von DMSO) betrug die Mittelliniensuturfläche im Mittel $0,040\text{mm}^2$ (Standardabweichung (SD) $\pm 0,007\text{mm}^2$; Minimum $0,028\text{mm}^2$, Maximum $0,049\text{mm}^2$).

Gruppe II (Implantation von Partikeln, Applikation von DMSO) zeigte einen um den Faktor 2,1 größeren Mittelwert für die Mittelliniensuturfläche als Gruppe I. Er lag bei $0,083\text{mm}^2$ (SD $\pm 0,010\text{mm}^2$; Minimum $0,066\text{mm}^2$, Maximum $0,097\text{mm}^2$).

In der Gruppe III (keine Implantation von Partikeln, Applikation von BOC-D-FMK) lag der Mittelwert bei $0,046\text{mm}^2$ (SD $\pm 0,015\text{mm}^2$; Minimum $0,031\text{mm}^2$, Maximum $0,072\text{mm}^2$). Das bedeutet verglichen mit Gruppe I eine Erhöhung des Wertes um den Faktor 1,2.

Der Mittelwert der Gruppe IV (Implantation von Partikeln, Applikation von BOC-D-FMK) betrug $0,056\text{mm}^2$ (SD $\pm 0,011\text{mm}^2$; Minimum $0,043\text{mm}^2$, Maximum $0,073\text{mm}^2$). Verglichen mit Gruppe II ist der Wert um den Faktor 1,5 reduziert.

Es konnte ein statistisch signifikanter Unterschied für die Mittelliniensuturfläche aller Gruppen im Vergleich zu Gruppe II festgestellt werden ($p < 0,001$).

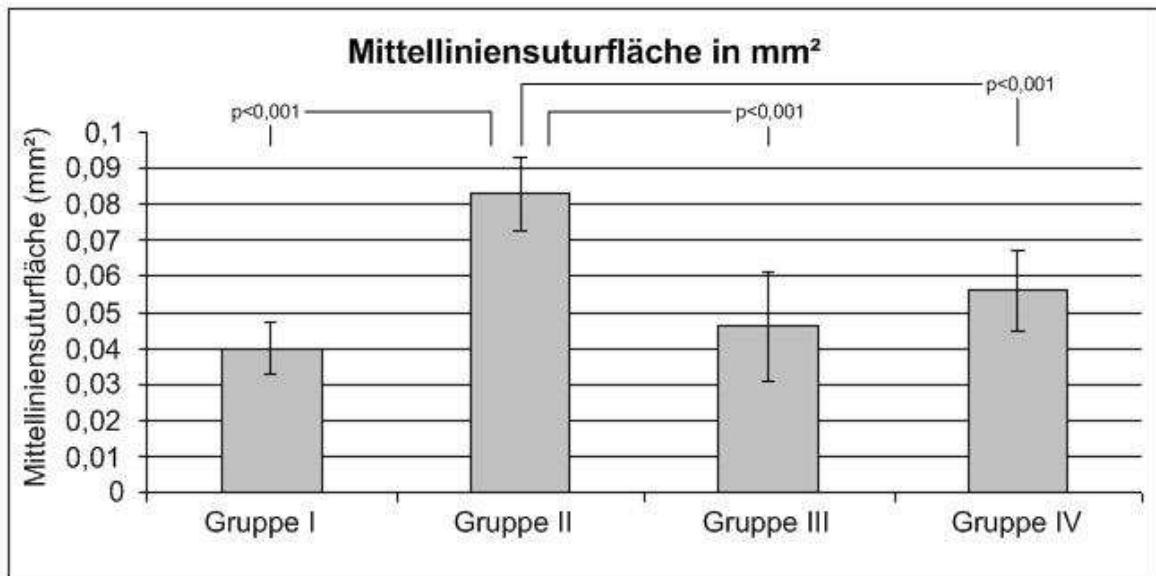


Diagramm 1: Größe der Mittelliniensuturfäche in mm²
(Mittelwert ± Standardabweichung; p-Wert gegenüber Gruppe II)

3.3.2 Osteolysen

Die Verteilung der gemessenen Osteolysen außerhalb der Mittelliniensuturfäche stellte sich wie nachfolgend beschrieben dar (siehe Anhang 7.3 Tabelle 3).

In Gruppe I (keine Partikel, DMSO) betrug der Mittelwert der gemessenen Osteolysenfläche 0,001mm² (SD ± 0,001mm²; Minimum 0mm², Maximum 0,002mm²).

In Gruppe II (Partikel, DMSO) lag der Mittelwert bei 0,059mm² (SD ± 0,02mm²; Minimum 0,031mm², Maximum 0,082mm²) und war somit gegenüber Gruppe I um den Faktor 56 erhöht.

Der Mittelwert in Gruppe III (keine Partikel, BOC-D-FMK) lag bei 0,0003mm² (SD ± 0,0004mm² Minimum 0µm², Maximum 0,001mm²).

In Gruppe IV (Partikel, BOC-D-FMK) lag der Mittelwert der gemessenen Osteolysenfläche bei 0,021mm² (SD ± 0,006mm²; Minimum 0,014mm², Maximum 0,027mm²) und war somit im Vergleich zu Gruppe II um den Faktor 2,8 reduziert.

Es konnte ein statistisch hoch signifikanter Unterschied für die Osteolysenfläche aller Gruppen im Vergleich zu Gruppe II festgestellt werden (p < 0,001).

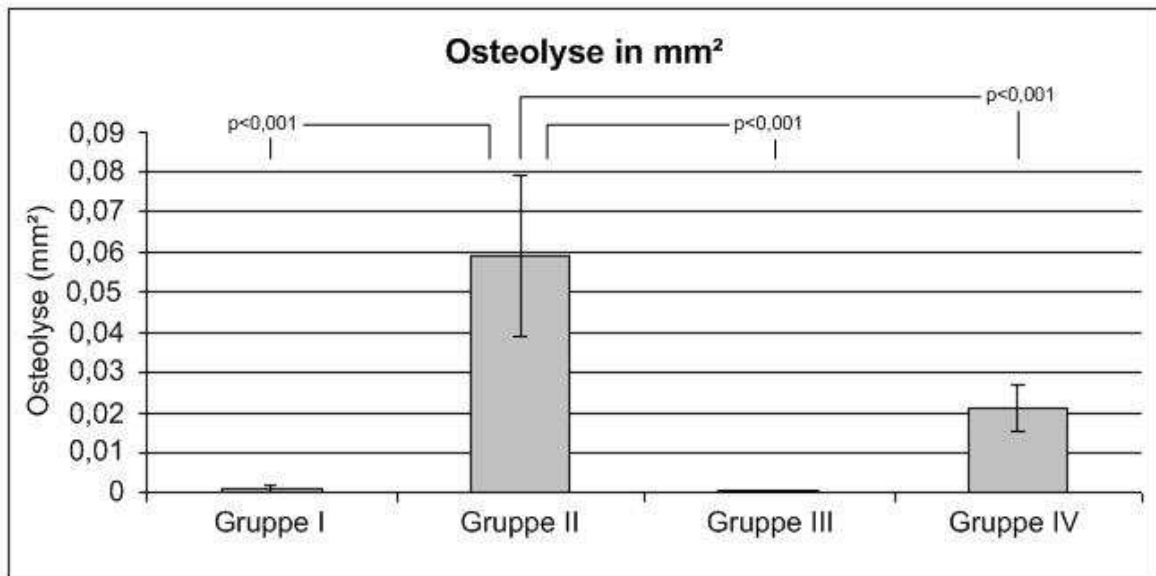


Diagramm 2: Fläche der Osteolysen in mm²

(Mittelwert ± Standardabweichung; p-Wert gegenüber Gruppe II)

3.3.3 Gewebeverteilung

Die Gewebeverteilung stellt die Anteile der Gewebearten Mittelliniensuturfläche und Osteolysen am gemessenen Gesamtgewebe dar (siehe Anhang 7.3 Tabelle 4).

In Gruppe I lag der Anteil der Mittelliniensuturfläche am Gesamtgewebe bei 5,34% ± 1,89%, wobei der minimale Wert 2,35% betrug und der maximale Wert 7,43%. Der Anteil der Osteolysen am Gesamtgewebe lag in dieser Gruppe bei 0,14% ± 0,15% mit einem minimalen Wert von 0% und einem maximalen Wert von 0,41%.

In Gruppe II lag der Anteil der Mittelliniensuturfläche am Gesamtgewebe bei 10,43% ± 1,83% und war somit doppelt so hoch wie in Gruppe I. Der minimale Wert betrug 7,9% und der maximale Wert 13,77%. Der Anteil der Osteolysen am Gesamtgewebe in Gruppe II betrug 7,44% ± 2,39%. Das heißt er war 53-mal so groß wie in Gruppe I. Der minimale Wert lag bei 3,02% und der maximale Wert bei 9,72%.

Der Anteil der Mittelliniensuturfläche am Gesamtgewebe in Gruppe III lag bei 6,16% ± 1,18%, wobei der minimale Wert 4,39% und der maximale Wert 7,43% betrug. Der Anteil der Osteolysen am Gesamtgewebe betrug 0,05% ± 0,07% bei einem minimalen Wert von 0% und einem maximalen Wert von 0,15%.

In Gruppe IV lag der Anteil der Mittelliniensuturfläche am Gesamtgewebe bei $5,63\% \pm 1,49\%$ und war somit 1,9-mal kleiner als in Gruppe II. Der minimale Wert lag bei $3,64\%$ und der maximale bei $7,62\%$. Der Anteil der Osteolysen am Gesamtgewebe lag in Gruppe IV bei $2,14\% \pm 0,75\%$. Das heißt, er war 3,5-mal kleiner als in Gruppe II. Der minimale Wert betrug $1,28\%$ und der maximale Wert $3,16\%$.

Somit konnte gezeigt werden, dass der Anteil der Mittelliniensuturfläche am Gesamtgewebe in Gruppe IV (Partikel, BOC-D-FMK) um 4,8 Prozentpunkte geringer war als in Gruppe II (Partikel, DMSO) und nur um 0,29 Prozentpunkte größer als in Gruppe I (keine Partikel, DMSO). Für alle Gruppen konnte ein statistisch hoch signifikanter Unterschied im Vergleich zu Gruppe II ($p < 0,001$) festgestellt werden.

Der Anteil der Osteolysen am Gesamtgewebe war in Gruppe IV um 5,3 Prozentpunkte geringer als in Gruppe II und um 2 Prozentpunkte größer als in Gruppe I. Es konnte ein statistisch hoch signifikanter Unterschied für alle Gruppen im Vergleich zu Gruppe II festgestellt werden ($p < 0,001$).

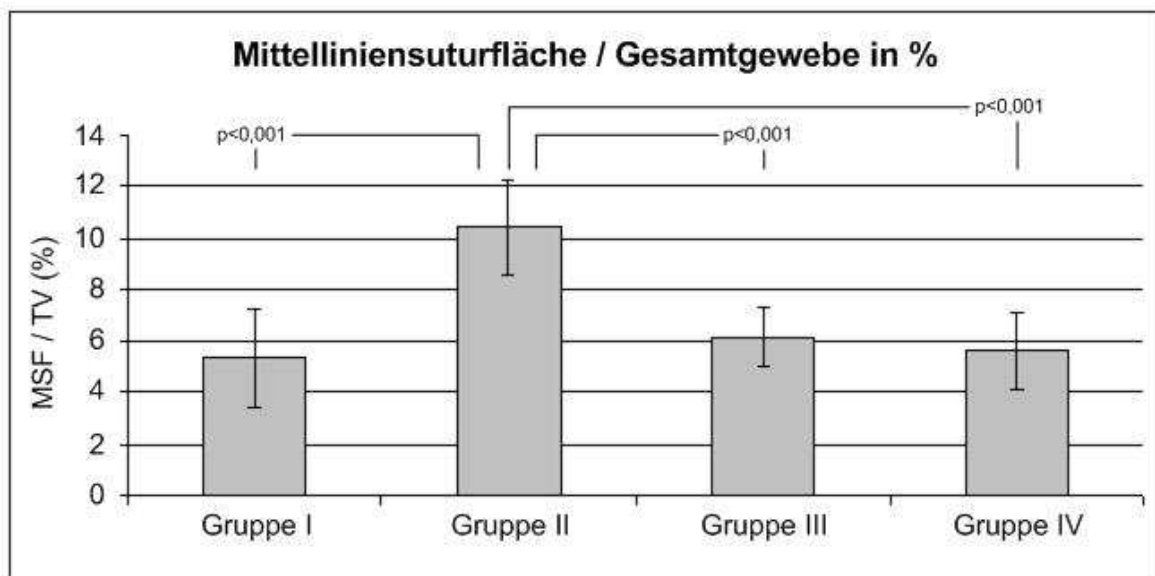


Diagramm 3: Anteil der Mittelliniensuturfläche am Gesamtgewebe in %
(Mittelwert \pm Standardabweichung; p-Wert gegenüber Gruppe II)

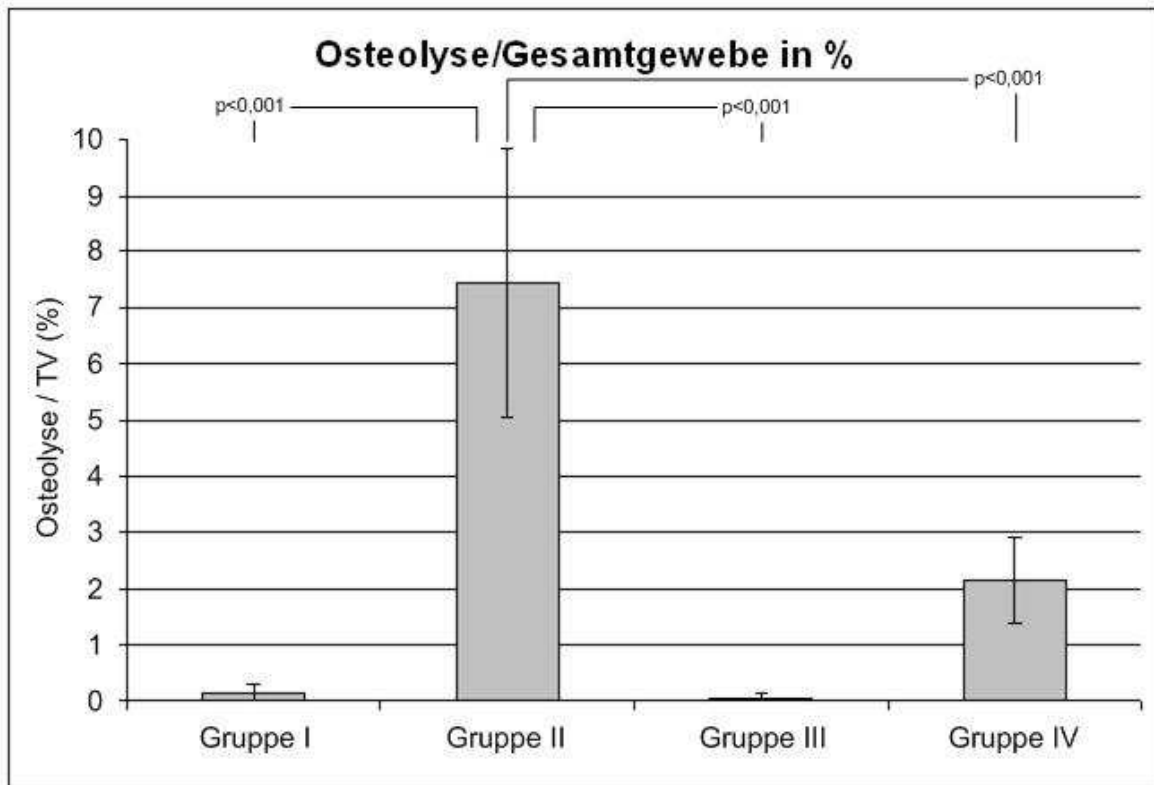


Diagramm 4: Anteil der Osteolysen am Gesamtgewebe in %
(Mittelwert ± Standardabweichung; p-Wert gegenüber Gruppe II)

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Caspase-3-cleaved-Färbung

Mit Hilfe der Caspase-3-cleaved-Färbung konnten spezifisch apoptotische Zellen nachgewiesen werden.

In Gruppe I und III konnte in einigen Osteoklasten eine milde Färbung nachgewiesen werden, während Makrophagen und Osteoblasten nicht angefärbt waren.

In den Präparaten der Gruppe II zeigte sich eine starke Anfärbung der Makrophagen mit Ausnahme der schaumzellartigen Makrophagen, die eine verminderte Färbung aufwiesen. Die Osteoblasten wiesen häufig eine Immunreaktion moderater Intensität auf, während die Osteoklasten teilweise in einer milden bis moderaten Intensität reagierten (siehe Anhang 7.1 Abbildung 20 und Abbildung 21).

In Gruppe IV waren weniger Makrophagen angefärbt als in Gruppe II. Sie wiesen auch eine geringere Farbintensität auf. Die Osteoblasten zeigten nur teilweise eine geringe Immunreaktion. Die Osteoklasten wiesen auch in dieser Gruppe eine partielle milde bis moderate Färbung auf (siehe Anhang 7.1 Abbildung 22 und Abbildung 23).

In allen Gruppen konnte die Immunreaktion der Makrophagen und Osteoblasten fast immer in der Nähe mikroskopisch sichtbarer Partikel, auf der den Partikeln zugewandten Seite des Knochens, nachgewiesen werden.

3.4.2 Anzahl der Osteoklasten

Aufgrund der fachlichen Kenntnisse in der Beurteilung immunhistochemisch gefärbter Präparate erfolgte die Ermittlung der Anzahl der Osteoklasten in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Landgraeber, Institut für Orthopädie, Universitätsklinikum Essen und Herrn PD Dr. Tötsch, Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen. Sie ergab folgende Ergebnisse (siehe Anhang 7.3 Tabelle 1):

Die Anzahl der Osteoklasten unterschied sich deutlich zwischen den einzelnen Gruppen. In Gruppe I wurden 3,86 (SD \pm 1,86; Minimum 2, Maximum 7) Osteoklasten pro Gesichtsfeld gezählt. In Gruppe II lag die durchschnittliche Anzahl bei 45,14 (SD \pm 20,42; Minimum 20, Maximum 70), während in Gruppe III 3,57 (SD \pm 1,51; Minimum 2, Maximum 6) gezählt wurden. Die durchschnittliche Anzahl der Osteoklasten in Gruppe IV lag bei 11,86 (SD \pm 4,06; Minimum 6, Maximum 18) pro Gesichtsfeld.

Somit waren bei den Mäusen mit Partikelimplantation in der mit DMSO behandelten Gruppe (Gruppe II) etwa viermal so viele Osteoklasten vorhanden wie in der mit BOC-D-FMK behandelten Gruppe (Gruppe IV).

Es konnte ein hoch signifikanter Unterschied aller Gruppen im Vergleich zu Gruppe II festgestellt werden ($p < 0,001$).

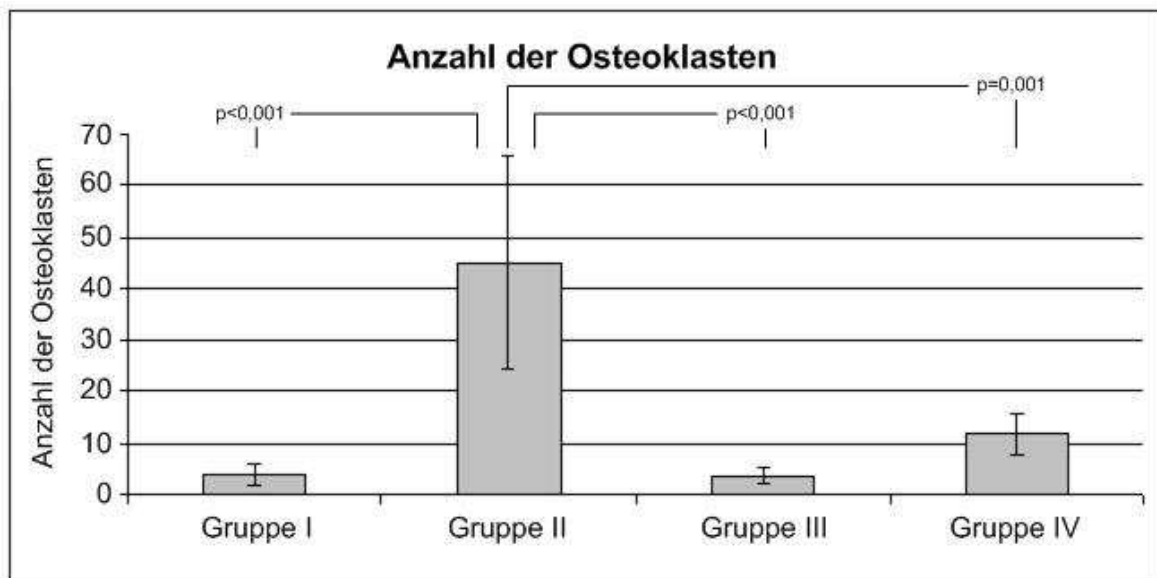


Diagramm 5: Anzahl der Osteoklasten pro Gesichtsfeld
(Mittelwert \pm Standardabweichung; p-Wert gegenüber Gruppe II)

3.5 Mikro-CT

3.5.1 Knochenvolumen BV (Bone volume)

Osteolytische Aktivität manifestiert sich mit einem Verlust an Knochenvolumen. Deswegen wurde das Knochenvolumen BV (Bone volume) verwendet, um die Unterschiede der osteolytischen Aktivität der einzelnen Gruppen aufzuzeigen (siehe Anhang 7.3 Tabelle 5).

Das durchschnittliche Knochenvolumen der Gruppe I (keine Partikel, DMSO) lag bei $0,523\text{mm}^3 \pm 0,033\text{mm}^2$, bei einem minimalen Wert von $0,493\text{mm}^3$ und einem maximalen Wert von $0,591\text{mm}^3$.

In der Gruppe II (Partikel, DMSO) lag das durchschnittliche Knochenvolumen mit $0,493\text{mm}^3$ (SD $\pm 0,008\text{mm}^2$; Minimum $0,486\text{mm}^3$, Maximum $0,506\text{mm}^3$) deutlich unter dem der Gruppen I, III und IV.

In der Gruppe III (keine Partikel, BOC-D-FMK) betrug das mittlere Knochenvolumen $0,530\text{mm}^3 \pm 0,034\text{mm}^2$, mit einem minimalen Wert von $0,493\text{mm}^3$ und einem maximalen Wert von $0,598\text{mm}^3$. Somit konnte in dieser Gruppe das größte Knochenvolumen gemessen werden.

Das mittlere Knochenvolumen in der Gruppe IV (Partikel, BOC-D-FMK) betrug $0,512\text{mm}^3 \pm 0,021\text{mm}^2$. Der minimale Wert lag bei $0,494\text{mm}^3$, während der maximale bei $0,557\text{mm}^3$ lag.

Das Knochenvolumen unterschied sich signifikant zwischen Gruppe I und II ($p=0,039$), zwischen Gruppe III und II ($p=0,017$) (Mäuse mit und ohne Partikelimplantation) und zwischen Gruppe IV und II ($p=0,048$) (Mäuse beider Gruppen mit Partikelimplantation, aber mit bzw. ohne Pan-Caspase Hemmung).

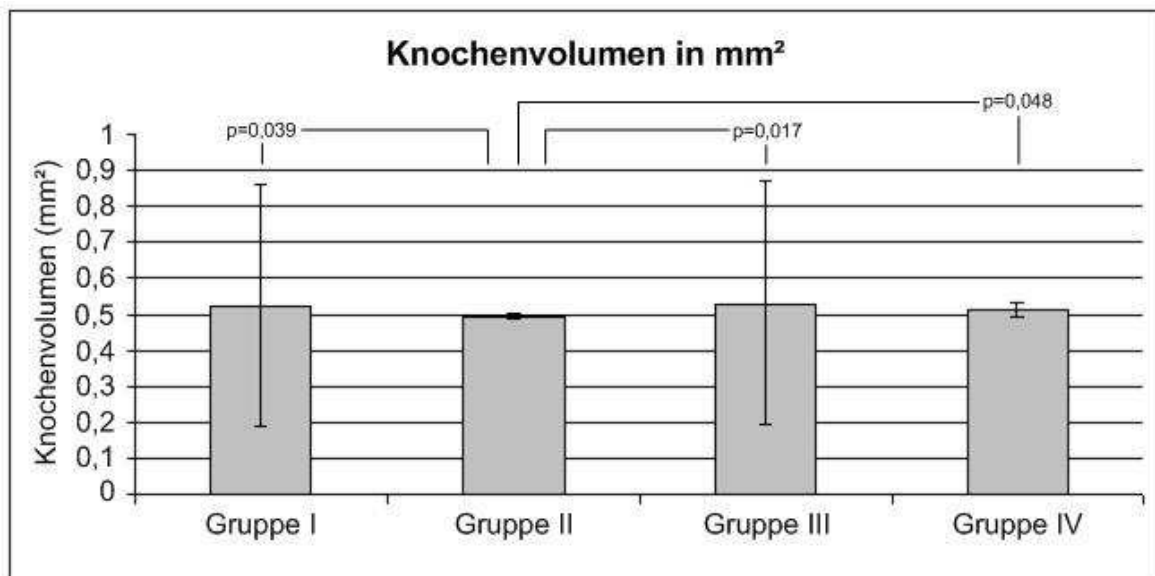


Diagramm 6: Knochenvolumen BV in mm²

(Mittelwert \pm Standardabweichung; p-Wert gegenüber Gruppe II)

3.5.2 Relatives Knochenvolumen BV/TV (Bone density)

Das relative Knochenvolumen gibt den Anteil des Knochens am gemessenen Gesamtgewebe an (siehe Anhang 7.3 Tabelle 6).

In Gruppe I betrug der mittlere Wert 6,18% (SD \pm 0,39%; Minimum 5,83%, Maximum 6,98%), während in Gruppe II das mittlere relative Knochenvolumen mit 5,81% (SD \pm 0,11%; Minimum 5,70%, Maximum 5,99%) deutlich verringert war. In der Gruppe III konnte mit 6,22% (SD \pm 0,38%; Minimum 5,75%, Maximum 6,97%) der größte Wert des relativen Knochenvolumens verzeichnet werden. Der Wert in Gruppe IV (Partikel, BOC-D-FMK) war mit 5,98% (SD \pm 0,24%; Minimum 5,75%, Maximum 6,43%) zwar gegenüber dem mittleren relativen Knochenvolumen der Gruppe I (keine Partikel, DMSO) reduziert, gegenüber dem der Gruppe II (Partikel, DMSO) jedoch gesteigert.

Zwischen Gruppe I und II ($p=0,034$) sowie zwischen Gruppe III und II ($p=0,019$) konnte ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Gruppe IV und II unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p=0,104$).

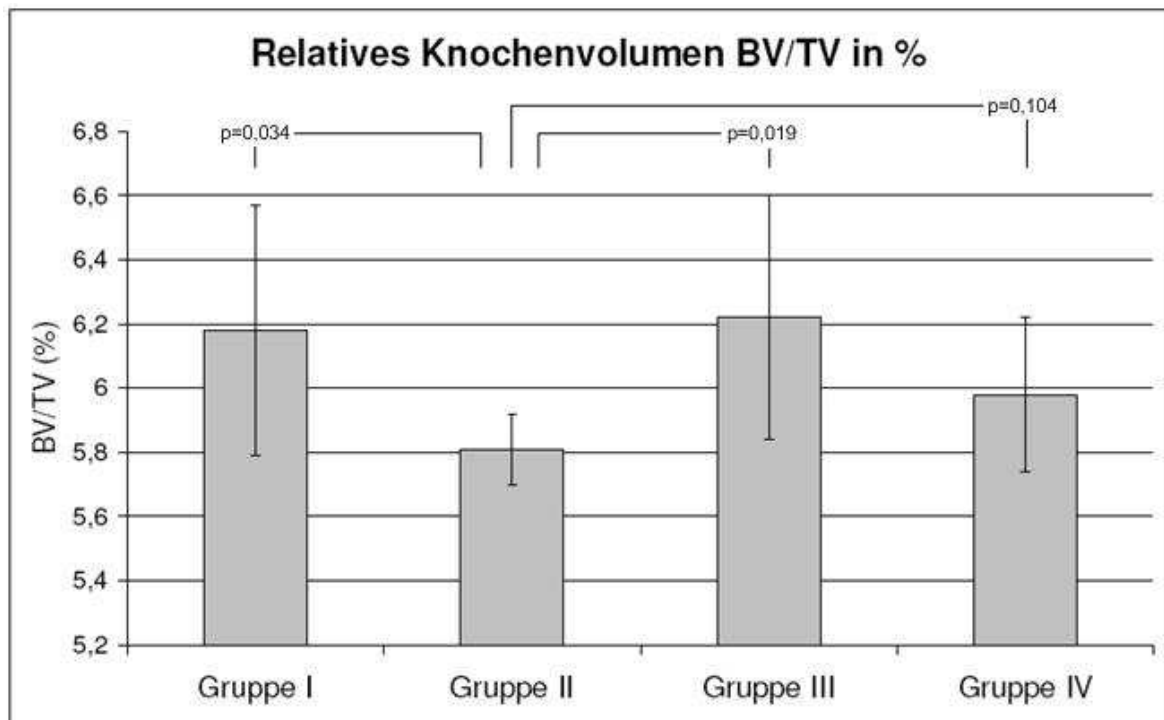


Diagramm 7: Relatives Knochenvolumen BV/TV in %
(Mittelwert \pm Standardabweichung; p-Wert gegenüber Gruppe II)

3.6 MouseTRAP 5b Assay

Der Serumspiegel von TRAP 5b gilt als Kennziffer für die Anzahl von aktiven Osteoklasten im Blut. Die Ergebnisse stellten sich, wie im Folgenden beschrieben, dar (siehe Anhang 7.3 Tabelle 7).

Die Serumspiegel von TRAP 5b in Gruppe I betrugen 0,078U/L (SD \pm 0,044U/L; Min 0,011U/L, Max 0,127U/L), während die der Gruppe II 0,147U/L (SD \pm 0,036U/L; Min 0,100, Max 0,196) betrugen. In Gruppe III lagen die TRAP 5b Serumspiegel bei 0,068U/L (SD \pm 0,025U/L; Min 0,015U/L, Max 0,087U/L). Die Serumspiegel der Gruppe IV betrugen 0,098U/L (SD \pm 0,046U/L; Min 0,004U/L, Max 0,133U/L).

Somit unterschieden sich die Serumspiegel der Mäuse mit und ohne Partikelimplantation (Gruppen I und II; $p=0,007$) und der Mäuse mit Partikelimplantation und unterschiedlicher Behandlung (Gruppen IV und II;

$p=0,046$) signifikant voneinander. Die TRAP 5b Serumspiegel der Gruppen III und II unterschieden sich hoch signifikant voneinander ($p<0,001$).

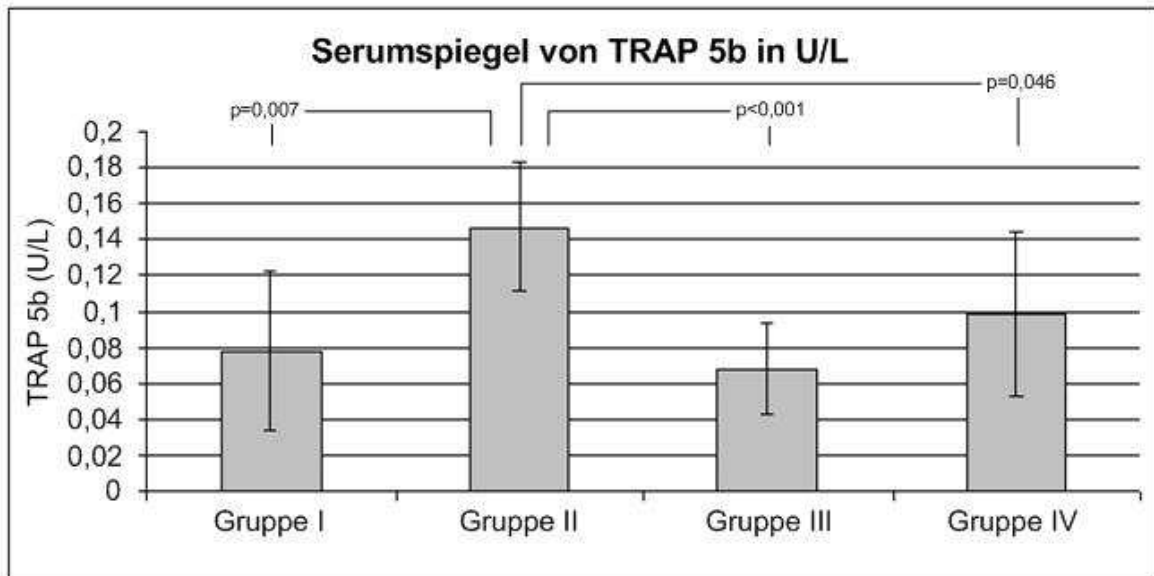


Diagramm 8: Serumspiegel von TRAP 5b in U/L
(Mittelwert \pm Standardabweichung; p-Wert gegenüber Gruppe II)

4 Diskussion

Die aseptische Prothesenlockerung durch Partikel induzierte Osteolyse ist der Hauptgrund für die Entstehung von Langzeitkomplikationen bei Totalendoprothesen (Jacobs et al. 2001). Neben den durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine ausgelösten rein inflammatorischen Vorgängen scheinen auch apoptotische Zellreaktionen eine Rolle bei der Aktivierung der Osteolysenbildung zu spielen (Landgraeber et al. 2008, Landgraeber et al. 2006, Huk et al. 2001, Wang et al. 2003, Zhang, Revell 1999). Es konnte bislang jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob die Apoptose im Kontext der aseptischen Endoprothesenlockerung einen protektiven oder einen begünstigenden Faktor für die Entstehung von Osteolysen darstellt.

Ziel der vorliegenden Studie war es zu ermitteln, ob die Inhibition, der im Rahmen der aseptischen Prothesenlockerung auftretenden Apoptose, die Partikel-induzierte Osteolyse reduziert.

4.1 Versuchsmodell

Das angewandte murine Modell zur Partikel induzierten Osteolyse hat sich im Rahmen verschiedener Studien gut etabliert. Durch den Gebrauch dieses Modells konnte die Beteiligung verschiedener Zellen und Faktoren im osteolytischen Prozess demonstriert werden. Im Hinblick auf die Ermittlung der genetischen Basis der Partikel induzierten Osteolyse fand das Modell in Studien mit Knock-out Mäusen Verwendung, um die Beziehungen zwischen genetischen Strukturen und deren Funktionen zu verdeutlichen. Des Weiteren wurde das murine Modell zur Beurteilung der Effekte verschiedener Medikamente oder Gen-Therapien auf die Abriebpartikel induzierte Osteolyse eingesetzt (von Knoch et al. 2004).

Zu Beginn basierte das Modell hauptsächlich auf dem Einsatz von Polymethylmethacryl (PMMA) Partikeln (Merkel et al. 1999) oder Titan Partikeln (Schwarz et al. 2000). Von Knoch et al. führten das murine Modell auf der Basis von UHMWPE Partikeln ein (von Knoch et al. 2004). Da heute Metall-UHMWPE Endoprothesen als internationaler Standard der Behandlung von degenerativen Gelenkerkrankungen gelten, stellen diese Abriebpartikel die häufigsten und

relevantesten Induktoren der Partikel induzierten Osteolyse dar (Kurtz et al. 1999, Willert et al. 1990). In vergleichenden Studien über die Effektivität von Polyethylen, PMMA und Titan Partikeln konnte gezeigt werden, dass Polyethylen die größten Osteolysen verursacht und eine stark erhöhte Anzahl von Osteoklasten hervorruft (von Knoch et al. 2004, Kwon et al. 2000). Aus diesen Gründen wurde für die vorliegende Arbeit ein auf UHMWPE Partikeln basierendes Modell ausgewählt, um die klinische Situation möglichst genau darzustellen.

Um signifikante Ergebnisse zu erzielen, wurde eine Versuchsdauer von 12 Tagen gewählt. Schwarz et al. konnten zeigen, dass die stärkste osteolytische Aktivität zwischen dem 5. und 10. postoperativen Tag vorliegt, während ab dem 10. postoperativen Tag die osteoblastische Aktivität überwiegt (Schwarz et al. 2000). Bei einer Beschränkung der Versuchsdauer auf 12 Tage kann demnach sicher von einem Erreichen des Maximums der Osteolyse innerhalb dieses Zeitraums ausgegangen werden.

4.2 Mikro-CT und Histologie im Vergleich

Seit der Einführung 1989 durch Feldkamp et al. (Feldkamp et al. 1989) konnte sich die Mikro-Computertomographie immer mehr als neue Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse dreidimensionaler Knochenstrukturen etablieren. In bisherigen Studien stand jedoch die methodische Entwicklung im Vordergrund. Um eine Einordnung und Standardisierung der Ergebnisse und der Anwendung dieser neuen Methode zu erreichen, wurden in einigen Studien die Ergebnisse der Mikro-Computertomographie mit Resultaten konventioneller histomorphometrischer Methoden verglichen (Müller et al. 1998, Uchiyama et al. 1997, Mitton et al. 1998, Cooper et al. 2004).

Bislang gilt die Histomorphometrie auf dem Gebiet der quantitativen Bestimmung von knöchernen Strukturparametern als Goldstandard (Müller et al. 1998, Engelke et al. 1999). Bei einer Ortsauflösung unter 1µm liefert sie zuverlässige Informationen über die Mineralisierung des Knochens, die Anzahl von Osteoblasten und Osteoklasten und gibt Auskunft über Knochenbildung, Knochenresorption und stabile Knochenoberflächen. Doch obwohl zweidimensionale histomorphometrische Techniken viele Informationen des

dynamischen Knochengewebes bereitstellen, können sie kein vollständiges Bild der dreidimensionalen Mikrostruktur des Knochens vermitteln (Cooper et al. 2003). Weitere Nachteile sind die aufwändige Probenpräparation (Engelke et al. 1999), sowie die aufgrund der Aufbereitungsmethode verhältnismäßig großen Abstände zwischen den einzelnen Schnitten. Hierdurch können vor allem kleine Veränderungen schnell übersehen werden (Wedemeyer et al. 2007).

Obwohl in vielen Studien gezeigt wurde, dass die Mikro-Computertomographie vergleichbare Ergebnisse wie konventionelle histomorphometrische Methoden bereitstellt (Müller et al. 1998, Mitton et al. 1998, Uchiyama et al. 1997, Cooper et al. 2004), weist sie Grenzen auf. Das Mikro-CT liefert keine Informationen über die Knochendynamik, wie Knochenresorption oder Knochenbildung (Cooper et al. 2003 und 2004, Müller et al. 1998). Des Weiteren ist die Darstellung struktureller Beschaffenheiten stark von der Auflösung abhängig. Nur hohe Auflösungen $<50\mu\text{m}$ liefern Werte, die der klassischen Histomorphometrie entsprechen (Mitton et al. 1998). Ein weiteres kritisches Problem stellt die Einstellung des Schwellenwertes im Rahmen der Bildsegmentierung dar. Der Schwellenwert beeinflusst signifikant die morphologischen Messergebnisse. Rüeegsegger et al. zeigten bei einer Auflösung von $14\mu\text{m}$ einen linearen Zusammenhang zwischen dem relativen Knochenvolumen (BV/TV) und der Höhe des Schwellenwertes. Eine Veränderung des Schwellenwertes um 10% verursachte eine Veränderung des relativen Knochenvolumens um 5% (Rüeegsegger et al. 1996). Es werden globale und lokale Schwellenwertverfahren unterschieden. Beim globalen Schwellenwertverfahren wird ein Schwellenwert für das gesamte Bild festgelegt. Dadurch ist es sehr anfällig für Helligkeitsveränderungen im Bild und kann nur für kontrastreiche Bilder eingesetzt werden. Das lokale Schwellenwertverfahren basiert auf lokalen Grauwertschwankungen innerhalb eines Bildes. Es berücksichtigt unterschiedliche Röntgenabschwächungen durch das inhomogene Material, wodurch eine genauere Darstellung der Grenzen des Objektes ermöglicht wird (Cooper et al. 2004). Die Wahl des Schwellenwertverfahrens wird im Rahmen der Bestimmung morphologischer Parameter mittels Mikro-CT kontrovers diskutiert. Einige Autoren ziehen ein globales Schwellenwertverfahren aufgrund des hohen Knochen/Mark Kontrastes (etwa 10:1) und der besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse vor (Rüeegsegger et al. 1996, Müller et al. 1998).

Andere Autoren halten ein globales Verfahren für unangemessen und favorisieren ein lokales Schwellenwertverfahren (Cooper et al. 2004).

Aufgrund des hohen Kontrastes zwischen Knochen und umliegendem Gewebe in den Proben dieser Studie wurde hier ein globales Schwellenwertverfahren angewendet. Sowohl Rüegsegger et al. als auch Müller et al. erzielten mittels dieses Verfahrens gute Ergebnisse. Des Weiteren konnte so eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Proben erreicht werden. Die im Rahmen eines lokalen Verfahrens aufgewiesenen Veränderungen der strukturellen Beschaffenheiten können aufgrund der unterschiedlichen Wahl des Schwellenwertes für einzelne Regionen zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Die Vorteile des Mikro-CTs liegen in der schnellen, nicht destruktiven und präzisen Beurteilung dreidimensionaler Knochenstrukturen. Es werden unbehandelte Proben verwendet, die anschließend für weitere Verfahren aufbereitet werden können. Da es sich um eine voll automatisierte Methode zur Quantifizierung der strukturellen Knochenbeschaffenheiten handelt, ist eine objektive und schnelle Ermittlung von Resultaten möglich (Wedemeyer et al. 2007). Im Vergleich zu histologischen Methoden besteht im Mikro-CT die Möglichkeit größere Datensätze zu generieren, die durch den voll automatisierten Mechanismus besser reproduziert werden können. Unterschiedliche Ergebnisse innerhalb des gleichen Präparates werden vom gleichen Untersucher in weniger als einem Prozent erhoben (Uchiyama et al. 1997). Auch kleine Veränderungen können aufgrund des geringen Abstandes von 20µm zwischen den einzelnen Schnitten sicher erfasst werden (Wedemeyer et al. 2007).

Eine dreidimensionale Darstellung der Architektur der Knochenstrukturen fördert die Einsicht in biomechanische Gegebenheiten des Knochens und des Knochenumbaus. Somit können physiologische und pathologische Prozesse genauer nachvollzogen werden (Cooper et al. 2003).

Insgesamt sollte die Methode der Mikro-Computertomographie als Ergänzung und nicht als Alternative der konventionellen histologischen Methoden gesehen werden (Wedemeyer et al. 2007, Cooper et al. 2004). In dieser Studie wurde die Mikrocomputertomographie neben der Histologie als zusätzliche Methode für die quantitative Beurteilung der Partikel induzierten Osteolyse verwendet. Die Ergebnisse unterstützen die im Rahmen der histologischen Untersuchung erzielten Resultate. Für die mit BOC-D-FMK behandelten Tiere (Gruppe IV)

konnte ein signifikant erhöhtes absolutes und relatives Knochenvolumen gegenüber den Tieren der Gruppe II ermittelt werden.

4.3 Auswertung

Eine Beteiligung von Apoptose im Prozess der aseptischen Prothesenlockerung wurde bereits in verschiedenen Studien beschrieben (Huk et al. 2001, Zhang, Revell 1999, Catelas et al. 1999, Landgraeber et al. 2006, Distler et al. 2005). Der Pan-Caspase-Hemmer BOC-D-FMK gilt als potenter Inhibitor der Apoptose (Gregoli, Bondurant 1999, Schrantz et al. 1999, Sheen-Chen et al. 2008, Kurosu et al. 2009). In der vorliegenden Studie konnte eine signifikante Reduktion der Partikel induzierten Osteolyse durch die Behandlung von Mäusen mit BOC-D-FMK erzielt werden.

Bei den Mäusen der Gruppe II führten die implantierten UHMWPE Partikel ohne therapeutische Intervention zur erhöhten Knochenresorption mit einer gesteigerten Anzahl von Osteoklasten. Die histologisch ermittelte Ausdehnung der Osteolysen und die Fläche der Mittelliniensutur waren in dieser Gruppe deutlich größer als in den Kontrollgruppen I und III. Im Mikro-CT zeigte sich ein signifikant erniedrigtes Knochenvolumen. Die größten Veränderungen fanden sich im Bereich der Mittelliniensutur. Diese Struktur wurde bereits in anderen Studien als geeigneter Analyseparameter zur Bestimmung des Ausmaßes der Osteolysen ermittelt (von Knoch et al. 2005, Schwarz et al. 2000) und kann als Hauptosteolyseort gewertet werden. Aus diesem Grund wurde der Fokus der Messungen in den Bereich der Mittelliniensutur gelegt.

Die Ergebnisse der mit BOC-D-FMK behandelten Tieren der Gruppe IV wirken den ungünstigen Partikel induzierten Effekten entgegen. Die Mittelliniensuturfläche war in der Gruppe IV deutlich kleiner als in den nicht spezifisch behandelten Tieren der Gruppe II. Auch die Gesamtfläche der Osteolysen war in Gruppe IV signifikant geringer als in Gruppe II. In der mikrotomographischen Untersuchung zeigte sich nach der Applikation von BOC-D-FMK ein deutlich höheres Knochenvolumen. Die Ergebnisse der Gruppe IV waren signifikant höher als die der Gruppe II. Diese Ergebnisse sprechen für eine effektive Hemmung der Knochenresorption durch BOC-D-FMK. Lediglich die Resultate des relativen

Knochenvolumens BV/TV zeigten keine signifikante Erhöhung der Werte von Gruppe IV gegenüber denen von Gruppe II. Dies kann auf eventuelle Messungenauigkeiten, oder die geringe Gruppengröße zurückzuführen sein. Da die Ergebnisse der Gruppe IV jedoch gegenüber Gruppe II deutlich erhöht sind, kann auch hier von einer Hemmung der Osteolyse durch Pan-Caspase-Inhibition ausgegangen werden. Im Hinblick auf die Ergebnisse des TRAP-5b Assays als Kennziffer für die Anzahl von Osteoklasten im Blut zeigte sich in Gruppe IV ein signifikant erniedrigter Serumspiegel gegenüber der Gruppe II. Folglich bewirkt BOC-D-FMK auch eine Inhibition der Osteoklastenaktivität.

Zusammenfassend sind alle erzielten Ergebnisse in Gruppe IV annähernd vergleichbar mit denen der Kontrollgruppen I und III und indizieren eine effektive Hemmung der Partikel induzierten Osteoklastendifferenzierung sowie der Knochenresorption durch BOC-D-FMK.

4.4 Die Rolle der Apoptose

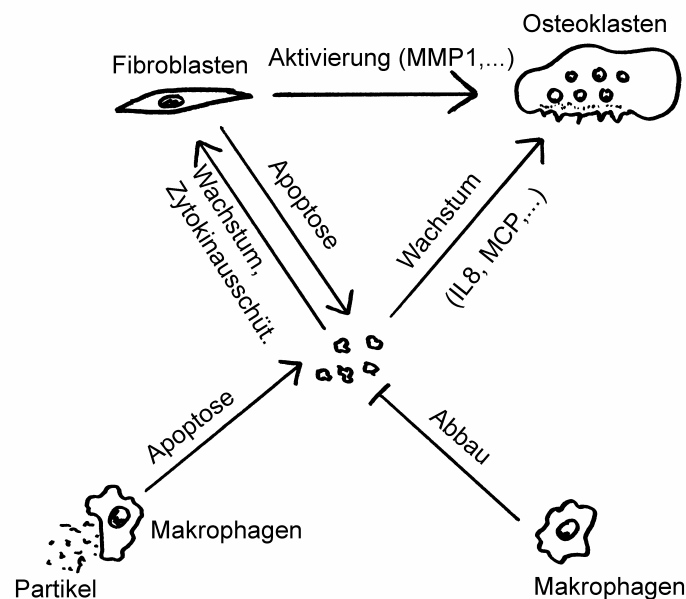
Die Rolle der Apoptose im Rahmen der aseptischen Prothesenlockerung wird bislang kontrovers diskutiert. Da Makrophagen eine wichtige Rolle im Prozess der periprotetischen Lockerung einnehmen, vertreten einige Autoren die Meinung, dass die Induktion der Apoptose von Makrophagen einen protektiven Effekt auf die Entstehung von Osteolysen ausübt (Huk et al. 2001, Zhang, Revell 1999, Catelas et al. 1999). Landgraeber et al. gehen hingegen davon aus, dass es sich hier um eine pathologische Apoptose handelt, wie sie im Rahmen der rheumatoiden Arthritis beschrieben wird (Landgraeber et al. 2006). Hierbei kommt es zu einer prolongierten Apoptose, die zu einem Circulus vitiosus führt, in dem Apoptose, Entzündungsreaktionen und Osteoklastenaktivierung beschleunigt werden (Distler et al. 2005). Dieser Pathomechanismus (siehe Abbildung 4) kann durch die im Rahmen der Apoptose entstehenden Apoptosekörper erklärt werden. Apoptosekörper sind membrangebundene Vesikel, die verschiedene zelluläre Komponenten enthalten und sich während der Apoptose von der sterbenden Zelle abteilen (Radic et al. 2004, Schiller et al. 2008). Unter physiologischen Bedingungen werden Apoptosekörper nach der Abspaltung von der apoptotischen Zelle schnell durch in der Nähe befindliche Makrophagen aufgenommen (Henson

et al. 2001, Ren et al. 1998). Die rasche Phagozytose stellt die anti-inflammatorische Entfernung von apoptotischen Zellüberresten sicher. Kommt es zu einer geminderten Phagozytose oder einer Überlastung des phagozytotischen Systems kann eine inflammatorische Antwort initiiert werden (Schiller et al. 2008). Wie bereits in früheren Studien beschrieben, induzieren apoptotische Zellüberreste die Bildung proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-6 und -8 (IL-6, IL-8), Monozyten Chemoattractant Protein-1 und -2 (MCP-1, MCP-2), Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 und Typ-1 Interferon (Cerri et al. 2006, Heyder et al. 2007). Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis konnte eine starke Aktivierung von Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) in synovialen Fibroblasten durch apoptotische Zellüberreste nachgewiesen werden (Distler et al. 2005). Die Aktivierung von MMP-1 führt zu einer gesteigerten Bildung von Osteoklasten und geht somit mit einer vermehrten Knochenresorption einher (Delaisse et al. 1993, Guo et al. 2004, Kido et al. 2004).

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Apoptosezyklus

Abriebpartikel werden von Makrophagen phagozytiert. Es kommt zur Apoptose der Makrophagen mit der Bildung von Apoptosekörpern. Durch die Überlastung des phagozytotischen Systems wird eine inflammatorische Antwort initiiert. Es kommt zur Bildung proinflammatorischer Zytokine, die das Wachstum von Fibroblasten und Osteoklasten begünstigen. Die Fibroblasten induzieren über die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) die Bildung von Osteoklasten.

IL8=Interleukin-8; MCP=Monozyten Chemoattractant Protein



Mittels der Caspase-3-cleaved-Färbung konnten in der vorliegenden Studie starke apoptotische Reaktionen in den Tieren der Gruppe II nachgewiesen werden. Die stärkste Apoptose wiesen Makrophagen in direkter Nähe zu den Partikeln auf. Auch die schwächer angefärbten Osteoblasten und Osteoklasten waren auf der den Partikeln zugewandten Seite des Knochens lokalisiert. In den Kontrollgruppen (Gruppe I und III) waren diese Zellen nicht angefärbt und wiesen somit keine erhöhte apoptotische Reaktion auf. Die Ergebnisse unterstützen die aufgestellte Hypothese, dass die Apoptose in Makrophagen und Osteoblasten durch Partikel induziert wird. Diese Aussage stimmt auch mit den Ergebnissen von Landgraeber et al. überein, denen der immunhistochemische Nachweis von apoptotischen Reaktionen in Makrophagen humaner Gelenkkapseln und Interfacemembranen gelang (Landgraeber et al. 2006, Landgraeber et al. 2008).

In den mit BOC-D-FMK behandelten Mäusen (Gruppe IV) war der Apoptosegrad der Makrophagen und Osteoblasten deutlich geringer als in Gruppe II, aber immer noch nachweisbar. Die in dieser Gruppe verzeichnete Reduktion der apoptotischen Reaktion ging mit einer signifikant erniedrigten Partikel induzierten Knochenresorption einher. Somit weisen die erzielten Ergebnisse darauf hin, dass die medikamentöse Hemmung der Apoptose in den Makrophagen und Osteoblasten die Größe der Partikel induzierten Osteolyse positiv beeinflusst.

Aufgrund der massiven Apoptose bei den Tieren der Gruppe II kann eine Überlastung des phagozytotischen Systems vermutet werden, wodurch nicht alle apoptotischen Zellüberreste entfernt werden konnten. Folglich kann die daraus resultierende gesteigerte Freisetzung von Zytokinen für die vermehrte Bildung von Osteoklasten und die gesteigerte Induktion der Apoptose von Osteoblasten in Gruppe II gegenüber Gruppe IV verantwortlich sein (Chen et al. 2005, Kuzushima et al. 2006). Als Indikator für die Überlastung des Systems können die in der Caspase-3-cleaved-Färbung nur schwach angefärbten schaumzellartigen Makrophagen gewertet werden. Diese Zellen waren nicht länger in der Lage die apoptotischen Überreste aufzunehmen und wurden ausschließlich in den Tieren der Gruppe II nachgewiesen (Schrijvers et al. 2005). Daher ist davon auszugehen, dass das Phagozytosesystem in Gruppe IV aufgrund der geringeren anfallenden Menge an apoptotischem Material weniger beansprucht wurde.

4.5 Grenzen des Modells

Das murine Calvaria Modell zur Partikel induzierten Osteolyse ist nicht identisch mit dem klinischen Prozess der aseptischen Prothesenlockerung bei Patienten mit totaler Hüftendoprothese. Während bei Patienten die Abriebpartikel kontinuierlich über einen langen Zeitraum entstehen, wird im Modell ein Vielfaches der jährlich in vivo entstehenden Partikel im Bolus implantiert. So gilt das Problem der Prothesenlockerung bei Patienten als Langzeitkomplikation, die erst im Laufe von Jahren auftritt, während im Kleintiermodell bereits nach 12 Tagen deutliche osteolytische Veränderungen nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren kommt es bei einer großen Menge an anfallenden Abriebpartikeln zu einer Dekompensation des Transportsystems über die perivaskulären Lymphgefäße (Willert et al. 1990). Dem Entstehen von Osteolysen kann im Modell somit nur geringfügig entgegengewirkt werden.

Ein weiterer wichtiger Unterschied ist das Fehlen eines Implantates im murinen Modell. Somit gehen die bei der Endoprothetik durch biomechanische Belastungen entstehenden Verschleißerscheinungen nicht in die Ergebnisse des Modells ein.

Im Kleintiermodell wurde aufgrund der anatomischen Verhältnisse der Maus der verhältnismäßig große Schädelknochen anstelle des kleinen Femurs verwendet. Die beiden Knochen weisen eine unterschiedliche Knochenstruktur auf. Während der Schädelknochen ein desmoider Knochen ist, handelt es sich beim Femur um einen Lamellenknochen.

Aus diesen Gründen ist eine exakte Übertragung der ermittelten Ergebnisse auf den Menschen nur bedingt möglich. Dennoch wird mit diesem Modell eine einfache und reproduzierbare Methode zur Darstellung der klinischen Problematik bereitgestellt. Das murine Modell eignet sich als sensitives, schnelles, günstiges und effektives Verfahren vor allem zur Analyse von pharmakologischen Wirkstoffen.

4.6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal in vivo gezeigt, dass eine Hemmung der Apoptose zu einer signifikanten Reduktion der Partikel induzierten Osteolyse führt. Obwohl die Apoptose als „sauberer“ Zelltod gilt, der keine inflammatorische Reaktion des umliegenden Gewebes bedingt (Cohen 1993, Stea et al. 2000), weisen die vorgestellten Ergebnisse darauf hin, dass ausreichend hohe Apoptoselevel zu einer Überlastung des phagozytotischen Systems führen. Somit kann der Großteil der anfallenden apoptotischen Zellüberreste nicht entfernt werden. In Kapitel 4.4 wurde erläutert, dass das vermehrte Aufkommen apoptotischer Zellüberreste zu einer gesteigerten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt. Diese kann für die Induktion der periprothetischen Osteolyse und in Folge dessen für die Prothesenlockerung verantwortlich sein.

Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen wurde eine Grundlage für zukünftige Untersuchungen geliefert. Ein Ansatz für weiterführende Studien wäre die Fragestellung, ob eine stärkere Reduktion der apoptotischen Reaktion zu einer vollständigen Prävention von der Entstehung Partikel induzierter Osteolysen führt. Dies könnte zum Beispiel durch die Entwicklung lokaler Applikationswege oder durch eine höhere Dosierung anti-apoptotischer Medikamente erreicht werden. Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt ist die Testung der verwendeten Prothesen-Werkstoffe auf ihre Neigung zur Apoptoseinduktion. In dieser Studie wurde ausschließlich die apoptotische Reaktion auf Polyethylenpartikel betrachtet. Um eine Aussage zu Unterschieden in der Apoptoseinduktion der Werkstoffe treffen zu können, müssen vergleichende Untersuchungen mit Polyethylen-, PMMA- und Titanpartikeln durchgeführt werden. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob verschiedene hüftimplantierte Patienten unterschiedlich stark apoptotisch reagieren.

Im Hinblick auf die klinische Situation der aseptischen Prothesenlockerung ist die Hemmung der apoptotischen Kaskade als potentieller neuer therapeutischer Ansatz zur Modulation der Partikel induzierten Osteolyse zu sehen. Aufgrund der bislang nicht vollständig einsehbaren Nebenwirkungen einer anti-apoptotischen Therapie ist diese Methode in der vorliegenden Form noch nicht einsetzbar. Ein besonderer Fokus muss hier auf das Entstehungsrisiko von Tumoren gelegt

werden, da die Apoptose ein natürliches Verfahren zur Elimination von irreparabel geschädigten Zellen mit hoher Entartungstendenz darstellt. Letztendlich muss sich in kontrollierten klinischen Studien herausstellen, welche Rolle die Inhibition der Apoptose in der nicht invasiven Prävention und Reduktion der Partikel induzierten Osteolyse beim Menschen einnimmt.

5 Zusammenfassung

Die aseptische Prothesenlockerung ist die häufigste Langzeitkomplikation nach totaler Hüftendoprothetik. Ein Hauptgrund dieser Implantatlockerung ist die Partikel induzierte Osteolyse. In vorangegangenen Studien konnte die Anwesenheit apoptotischer Makrophagen, Riesenzellen, Fibroblasten und T-Lymphozyten in Gelenkkapseln und periprothetischen Interfacemembranen von Patienten mit aseptischer Hüftimplantatslockerung gezeigt werden. Ziel der vorliegenden Studie war es in einem murinen Calvaria Modell zur Partikel induzierten Osteolyse zu ermitteln, ob die Inhibition der Apoptose mittels des Pan-Caspase-Inhibitors BOC-D-FMK (t-butoxycarbonyl-aspartat-fluoromethyl-ke-ton) zu einer Reduktion der aseptischen Lockerung führt.

Die Osteolyse wurde im Tiermodell mit UHMWPE (Ultrahochmolekulargewichtiges Polyethylen) Partikeln induziert. Gesunde 12 Wochen alte männliche C57BL/6J Mäuse wurden in 4 Gruppen eingeteilt und für 12 Tage mit BOC-D-FMK, beziehungsweise mit einer Puffer-Lösung in einer Dosierung von 3mg/kg Körpergewicht behandelt. Das Ausmaß der Knochenresorption wurde mit der Mikro-Computertomographie (μ -CT), histomorphometrisch und mittels der TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) -5b Serumanalyse bestimmt. Zur Bestimmung der Apoptoserate diente die immunhistochemische Caspase-3-cleaved-Färbung.

Die Ergebnisse zeigen die Induktion einer starken apoptotischen Reaktion der Makrophagen und Osteoblasten sowie die Induktion einer gesteigerten Knochenresorption durch UHMWPE Partikel. Die peritoneale Applikation von BOC-D-FMK wirkte diesen Partikel induzierten Effekten signifikant entgegen.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie scheint es wahrscheinlich, dass die Apoptose im Rahmen der Partikel induzierten Osteolyse pathologisch erhöht ist. Die Überlastung des phagozytotischen Systems und die Anhäufung der Apoptosekörper führt zu einer gesteigerten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, die für die Induktion der Osteolyse verantwortlich sind. In der vorliegenden Studie konnte zum ersten Mal in vivo gezeigt werden, dass eine Reduktion der Apoptose zu einer signifikanten Reduktion der Partikel induzierten Osteolyse führt. Im Hinblick auf die klinische Situation der aseptischen Prothesenlockerung ist die apoptotische Kaskade als potentieller therapeutischer Ansatzpunkt zur Modulation der Partikel induzierten Osteolyse zu sehen.

6 Literaturverzeichnis

1. Ashkenazi, A., Dixit, V.M. (1998): Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 281, 1305-1308.
2. Borah, B., Gross, G.J., Dufresne, T.E., Smith, T.S., Cockman, M.D., Chmielewski, P.A., Lundy, M.W., Hartke, J.R., Sod, E.W. (2001): Three-dimensional microimaging (Mrmicrol and microCT), finite element modeling, and rapid prototyping provide unique insights into bone architecture in osteoporosis. *Anat Rec* 265, 101–110.
3. Bühling, K.J., Lepenies, J., Witt, K. (2004): Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie. 3. Auflage. München, Jena: Elsevier Urban&Fischer; bes. S.15-16, S.104.
4. Callaghan, J.J., Salvati, E.A., Pelicci, P.M., Wilson, P.D. Jr, Ranawat, C.S. (1985): Results of revision for mechanical failure after cemented total hip replacement, 1979 to 1982: a two to five year follow up. *J Bone Joint Surg* 67-A, 1074-1085.
5. Catelas, I., Petit, A., Zukor, D.J., Marchand, R., Yahia, L., Huk, O.L. (1999): Induction of macrophage apoptosis by ceramic and polyethylene particles in vitro. *Biomaterials* 20(7), 625-630.
6. Cerri, C., Chimenti, D., Conti, I., Neri, T., Paggiaro, P., Celi, A. (2006): Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells. *J Immunol* 177(3), 1975-1980.
7. Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G.K. (2008): Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 151(1), 10-27.
8. Cohen, J.J. (1993): Apoptosis. *Immunol Today* 14(3), 126-130.
9. Cooper, D.M., Matyas, J.R., Katzenberg, M.A., Hallgrímsson, B. (2004): Comparison of microcomputed tomographic and microradiographic measurements of cortical bone porosity. *Calcif Tissue Int* 74, 437-447.
10. Cooper, D.M.L., Turinsky, A.L., Sensen, C.W., Hallgrímsson, B. (2003): Quantitative 3D analysis of the canal network in cortical bone by micro-computed tomography. *The anatomical record* 274B, 169-179.

11. Delaisse, J.M., Eeckhout, Y., Neff, L., Francois-Gillet, C., Henriët, P., Su, Y., Vaes, G., Baron, R. (1993): (Pro)collagenase (matrix metalloproteinase-1) is present in rodent osteoclasts and in the underlying bone-resorbing compartment. *J Cell Sci* 106, 1071-1082.
12. Distler, J.H., Jungel, A., Huber, L.C., Seemayer, C.A., Reich, C.F., Gay, R.E., Michel, B.A., Fontana, A., Gay, S., Pisetsky, D.S., Distler, O. (2005): The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(8), 2892-2897.
13. Earnshaw, W. C., Martins, L. M. & Kaufmann, S. H. (1999): Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383–424.
14. Engelke, K., Karolczak, M., Lutz, A., Seibert, U., Schaller, S., Kalender, W. (1999): Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure. *Radiologe.* 39(3), 203-212.
15. Feldkamp, L.A., Goldstein, S.A., Parfitt, A.M., Jasion, G., Kleerekoper, M. (1989): The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 4, 3–11.
16. Fisher, J.E., Rogers, M.J., Halasy, J.M., Luckman, S.P., Hughes, D.E., Masarachia, P.J., Wesolowski, G., Russell, R.G., Rodan, G.A., Reszka, A.A. (1999): Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 33-38.
17. Gregoli, P.A., Bondurant, M.C. (1999): Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. *J Cell Physiol* 178(2), 133-143.
18. Gruss, H.J., Dower, S.K. (1995): Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood.* 85(12), 3378-3404.
19. Guo, L.J., Xie, H., Zhou, H.D., Luo, X.H., Peng, Y.Q., Liao, E.Y. (2004): Stimulation of RANKL and inhibition of membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression by parathyroid hormone in normal human osteoblasts. *Endocr Res* 30, 369-377.

20. Harris, W.H. (1995): The problem is osteolysis. Clin Orthop Relat Res. 311, 46-53.
21. Harris, W.H. (2001): Wear and periprosthetic osteolysis: the problem. Clin Orthop Relat Res 393, 66-70.
22. Hengartner, M.O. (2000): The biochemistry of apoptosis. Nature 407, 770-776.
23. Henson, P.M., Bratton, D.L., Fadok, V.A. (2001): Apoptotic cell removal. Curr Biol 11(19), 795-805.
24. Heyder, P., Bekeredjian-Ding, I., Parcina, M., Blank, N., Ho, A.D., Herrmann, M., Lorenz, H.M., Heeg, K., Schiller, M. (2007): Purified apoptotic bodies stimulate plasmacytoid dendritic cells to produce IFN-alpha. Autoimmunity 40(4), 331-332.
25. Huk, O.L., Zukor, D.J., Ralston, W., Lisbona, A., Petit, A. (2001): Apoptosis in interface membranes of aseptically loose total hip arthroplasty. J Mater Sci Mater Med 12(7), 653-658.
26. Ingham, E., Green, T.R., Stone, M.H., Kowalski, R., Watkins, N., Fisher, J. (2000): Production of TNF-alpha and bone resorbing activity by macrophages in response to different types of bone cement particles. Biomaterials 21, 1005-1013.
27. Jacobs, J.J., Roebuck, K.A., Archibeck, M., Hallab, N.J., Glant, T.T. (2001): Osteolysis: Basic Science. Clin Orthop 393, 71-77.
28. Jiang, Y., Zhao, J., Genant, H.K. (2002): Macro- and microimaging of bone architecture. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2nd ed. New York: Academic Press 1599–1623.
29. Kido, A., Pap, G., Nögler, D.K., Ziomek, E., Ménard, R., Neumann, H.W., Roessner, A. (2004): Protease expression in interface tissues around loose arthroplasties. Clin Orthop Relat Res. 425, 230-236.
30. Kim, Y.H., Kim, J.S., Cho, S.H. (1999): Primary total hip arthroplasty with cementless porous-coated anatomic total hip prosthesis: 10- to 12year results of prospective and consecutive series. J Arthroplasty 14, 538-548.
31. Kurosu, T., Ohki, M., Wu, N., Kagechika, H., Miura, O. (2009): Sorafenib induces apoptosis specifically in cells expressing BCR/ABL by inhibiting its kinase activity to activate the intrinsic mitochondrial pathway. Cancer Res. 69(9), 3927-3936.

32. Kurtz, S.M., Muratoglu, O.K., Evans, M., Edidin, A.A. (1999): Advances in the processing, sterilization, and crosslinking of ultra-high molecular weight polyethylene for total joint arthroplasty. *Biomaterials* 20(18), 1659-1688.
33. Kwon, S.Y., Maloney, W.J., Bataractcha, T., Clohisy, J., Sung, J.H., Erdmann, J., Teitelbaum, S.L. (2000): A simple animal model for particulate debris-induced osteolysis using mouse. 46th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, Orlando, Florida.
34. Landgraeber, S., Toetsch, M., Wedemeyer, C., Saxler, G., Tsokos, M., von Knoch, F., Neuhauser, M., Loer, F., von Knoch, M. (2006): Over-expression of p53/BAK in aseptic loosening after total hip replacement. *Biomaterials* 27(15), 3010-3020.
35. Landgraeber, S., von Knoch, M., Löer, F., Wegner, A., Tsokos, M., Hußmann, B., Totsch, M. (2008): Extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis in aseptic loosening after total hip replacement. *Biomaterials* 29(24-25), 3444-3450.
36. Levin, J., Bang, F.B. (1968): Clottable protein in Limulus; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh.* 19(1), 186-197.
37. Löffler, G., Petrides, P.E. (2003): *Biochemie & Pathobiochemie*. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York (usw.): Springer Verlag; s. bes. S. 213-215, S.1167.
38. Merkel, K.D., Erdmann, J.M., McHugh, K.P., Abu-Amer, Y., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L. (1999): Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis. *Am J Pathol* 154, 203-210.
39. McKellop, H., Shen, F.W., Lu, B., Campbell, P., Salovey, R. (1999): Development of an extremely wear-resistant ultra high molecular weight polyethylene for total hip replacements. *J Orthop Res* 17 (2), 157-167.
40. Mitton, D., Cendre, E., Roux, J.P., Arlot, M.E., Peix, G., Rumelhart, C., Babot, D., Meunier, P.J. (1998): Mechanical properties of ewe vertebral cancellous bone compared with histomorphometry and high-resolution computed tomography parameters. *Bone* 22(6), 651-658.
41. Müller, R., Van Campenhout, H., Van Damme, B., Van Der, P.G., Dequeker, J., Hildebrand, T., Rügsegger, P. (1998): Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 23(1), 59-66.

42. Muratoglu, O.K., Bragdon, C.R., O'Connor, D.O., Jasty, M., Harris, W.H. (2001): A novel method of cross-linking ultra-high-molecular-weight polyethylene to improve wear, reduce oxidation, and retain mechanical properties. Recipient of the 1999 HAP Paul Award. *J Arthroplasty* 16 (2), 149-160.
43. Nagata, S. (1997): Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
44. Nieder, C., Petersen, S., Petersen, C., Thames, H.D. (2001): The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in Hodgkin's or non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol* 80, 2-8.
45. Purdue, P.E., Koulouvaris, P., Potter, H.G., Nestor, B.J., Sculco, T.P. (2007): The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 454, 251-261.
46. Radic, M., Marion, T., Monestier, M. (2004): Nucleosomes are exposed at the cell surface in apoptosis. *J Immunol* 172(11), 6692-6700.
47. Ren, Y., Savill, J. (1998): Apoptosis: the importance of being eaten. *Cell Death Differ* 5(7), 563-568.
48. Revell P.A. (2008): The combined role of wear particles, macrophages and lymphocytes in the loosening of total joint prostheses. *J. R. Soc. Interface* 5, 1263-1278.
49. Rüegsegger, P., Koller, B., Müller, R. (1996): A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int* 58(1), 24-29.
50. Sandell, L.J., Silva, M.J. (2001): What's new in orthopaedic research. *J Bone Joint Surg Am* 83-A(7), 1117-1124.
51. Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L.H. (1994): Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *PNAS USA* 92, 9238-9242.
52. Schiller, M., Bekeredjian-Ding, I., Heyder, P., Blank, N., Ho, A.D., Lorenz, H.M. (2008): Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death Differ* 15(1), 183-191.
53. Schrantz, N., Blanchard, D.A., Auffredou, M.T., Sharma, S., Leca, G., Vazquez, A. (1999): Role of caspases and possible involvement of retinoblastoma protein during TGFbeta-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *Oncogene* 18(23), 3511-3519.

54. Schwarz, E.M., Benz, E.B., Lu, A.P., Goater, J.J., Mollano, A.V., Rosier, R.N., Puzas, J.E., Okeefe, R.J. (2000 a): Quantitative small-animal surrogate to evaluate drug efficacy in preventing wear debris-induced osteolysis. *J Orthop Res.* 18(6), 849-855.
55. Schwarz, E.M., Lu, A.P., Goater, J.J., Benz, E.B., Kollias, G., Rosier, R.N., Puzas, J.E., O'Keefe, R.J. (2000 b): Tumor necrosis factor-alpha/nuclear transcription factor-kappaB signaling in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 18(3), 472-480.
56. Sheen-Chen, S.M., Hung, K.S., Eng, H.L. (2008): Effect of Boc-D-Fmk on hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in rat and survival rate after endotoxin challenge. *J Gastroenterol Hepatol.* 23(8 Pt 1), 1276-1279.
57. Stea, S., Visentin, M., Granchi, D., Cenni, E., Ciapetti, G., Sudanese, A., Toni, A. (2000): Apoptosis in peri-implant tissue. *Biomaterials* 21(13), 1393-13398.
58. Takeuchi, A., Uesugi, K., Takano, H., Suzuki, Y. (2002): Submicrometer-resolution three-dimensional imaging with hard x-ray imaging microtomography. *Rev Sci Instrum* 73, 4246–4249.
59. Uchiyama, T., Tanizawa, T., Muramatsu, H., Endo, N., Takahashi, H.E., Hara, T. (1997): A morphometric comparison of trabecular structure of human ilium between microcomputed tomography and conventional histomorphometry. *Calcif Tissue Int* 61(6), 493-498.
60. Villa, P., Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C. (1997): Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci.* 22(10), 388-393.
61. von Knoch, F., Heckeley, A., Wedemeyer, C., Saxler, G., Hilken, G., Henschke, F., Löer, F., von Knoch, M. (2005 a): The effect of simvastatin on polyethylene particleinduced osteolysis. *Biomaterials* 26, 3549-3555.
62. von Knoch, F., Heckeley, A., Wedemeyer, C., Saxler, G., Hilken, G., Henschke, F., Löer, F., von Knoch, M. (2005 b): Suppression of Polyethylene Particle-Induced Osteolysis by Exogenous Osteoprotegerin. *Journal of Biomedical Materials Research* 75 (2), 288-294.
63. von Knoch, F., Wedemeyer, C., Heckeley, A., Sprecher, C., Saxler, G., Hilken, G., Henschke, F., Bereiter, H., Löer, F., von Knoch, M. (2005 c): A comparison of the antiresorptive effects of bisphosphonates and statins

- polyethylene particle-induced osteolysis. Biomedizinische Technik 50 (6), 195-200.
64. von Knoch, M., Jewison, D.E., Sibonga, J.D., Sprecher, C., Morrey, B.F., Löer, F., Berry, D.J., Scully, S.P. (2004): The effectiveness of polyethylene versus titanium particles in inducing osteolysis in vivo. J Orthop Res 22, 237-243.
65. von Knoch, M., Wedemeyer, C., Pingsmann, A., von Knoch, F., Hilken, G., Sprecher, C., Henschke, F., Barden, B., Loer, F. (2005): The decrease of particle-induced osteolysis after a single dose of bisphosphonate. Biomaterials 26(14), 1803-1808.
66. Wang, M.L., Tuli, R., Manner, P.A., Sharkey, P.F., Hall, D.J., Tuan, R.S. (2003): Direct and indirect induction of apoptosis in human mesenchymal stem cells in response to titanium particles. J Orthop Res 21(4), 697-707.
67. Wedemeyer, C., Kauther, M.D., Hanenkamp, S., Nüchel, H., Bau, M., Siffert, W., Bachmann, H.S. (2009): BCL2-938C>A and CALCA-1786T>C polymorphisms in aseptic loosened total hip arthroplasty. Eur J Med Res. 14(6), 250-255.
68. Wedemeyer, C., von Knoch, F., Pingsmann, A., Hilken, G., Sprecher, C., Saxler, G., Henschke, F., Löer, F., von Knoch, M. (2005): Stimulation of Bone Formation by Zoledronic Acid in Particle-Induced Osteolysis. Biomaterials 26, 3719-3725.
69. Wedemeyer, C., Xu, J., Neuerburg, C., Landgraeber, S., Malyar, N.M., von Knoch, F., Gosheger, G., von Knoch, M., Löer, F., Saxler, G. (2007): Particle-induced osteolysis in three-dimensional micro-computed tomography. Calcif Tissue Int. 81(5), 394-402.
70. Willert, H.G., Bertram, H., Buchhorn, G.H. (1990): Osteolysis in alloarthroplasty of the hip. The role of ultra-high molecular weight polyethylene wear particles. Clin Orthop 258, 95-107.
71. Wülker, N., Kluba, T., Rehart S., Reize, P., Roetman, B., Rudert, M. (2005): Hüfte, Becken Oberschenkel. In: Wülker, N. (Hrsg.): Taschenlehrbuch der Orthopädie und Unfallchirurgie. S.20. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
72. Zhang, X.S., Revell, P.A. (1999): In situ localization of apoptotic changes in the interface membrane of aseptically loosened orthopaedic implants. J Mater Sci Mater Med 10(12), 879-883.

7 Anhang

7.1 Bilder

7.1.1 Mittelliniensuturfläche

Abbildung 5: Gruppe I, Maßstab: 100µm, 100-fache Vergrößerung
Die Mittelliniensuturfläche (grün umrandet) ist nicht vergrößert und scharf begrenzt.



Abbildung 6: Gruppe II, Maßstab: 100µm, 100-fache Vergrößerung
Die Mittelliniensuturfläche (grün umrandet) stellt sich stark vergrößert dar. Sie ist unscharf begrenzt und die Knochenoberfläche unregelmäßig.

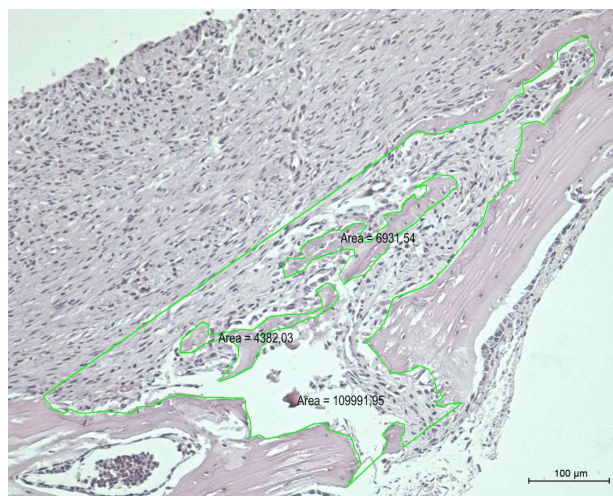


Abbildung 7: Gruppe III, Maßstab: 100µm, 100-fache Vergrößerung
Wie in Gruppe I ist die Mittelliniensuturfläche (grün umrandet) nicht vergrößert und scharf begrenzt.

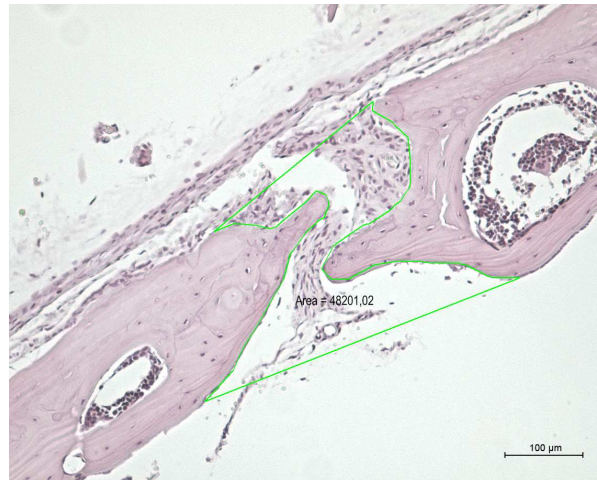


Abbildung 8: Gruppe IV, Maßstab: 100µm, 100-fache Vergrößerung
Die Mittelliniensuturfläche (grün umrandet) ist vergrößert, aber deutlich kleiner als in Gruppe II. Es kam zum Einbruch des Markraumes in das Bindegewebe der Mittelliniensuturfläche.



7.1.2 Gesamtgewebe

Abbildung 9: Gruppe I, Maßstab: 1000µm, 20-fache Vergrößerung

In Gruppe I zeigt sich eine scharf konturierte Knochenoberfläche mit nur vereinzelten Osteolysen auf beiden Seiten der Mittelliniensuturfläche. Die Gesamtmessfeldfläche ist grün umrandet und beinhaltet die Fläche des Knochengewebes (einschließlich der Markräume), der Mittelliniensutur und der Osteolysen.



Abbildung 10: Gruppe II, Maßstab: 1000µm, 20-fache Vergrößerung

In Gruppe II zeigt sich eine sehr unregelmäßige Knochenoberfläche mit vielen, teils großen Osteolysen auf beiden Seiten der Mittelliniensuturfläche. Das Narbengewebe ist stark ausgeprägt mit nekrotischen Veränderungen. Die Gesamtmessfeldfläche ist grün umrandet und beinhaltet die Fläche des Knochengewebes (einschließlich der Markräume), der Mittelliniensutur und der Osteolysen.

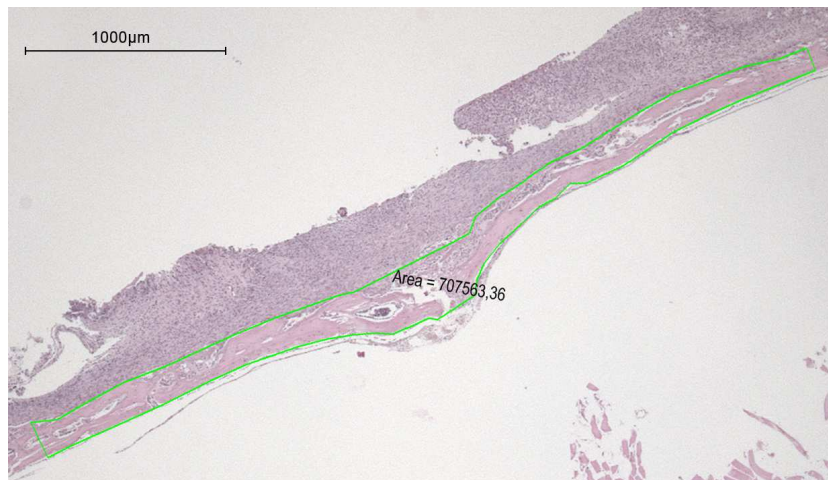


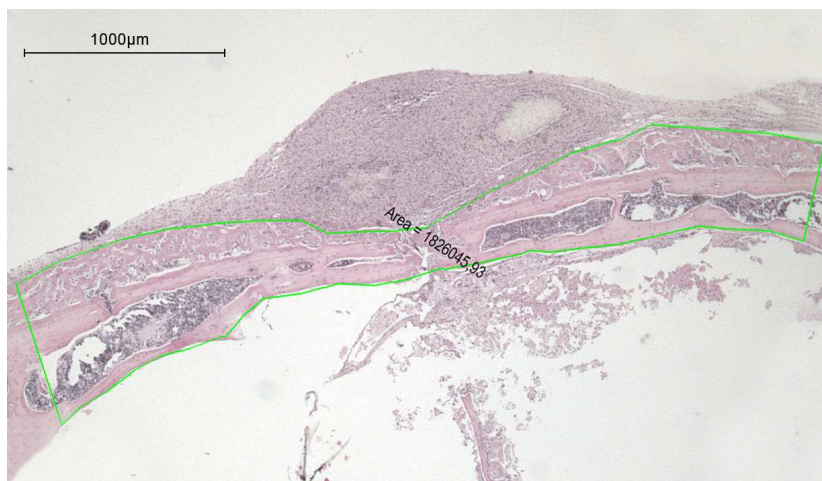
Abbildung 11: Gruppe III, Maßstab: 1000µm, 20-fache Vergrößerung

Ähnlich wie in Gruppe I zeigt sich in Gruppe III eine scharf konturierte Knochenoberfläche mit nur vereinzelten Osteolysen auf beiden Seiten der Mittelliniensuturfläche. Die Gesamtmessfeldfläche ist grün umrandet und beinhaltet die Fläche des Knochengewebes (einschließlich der Markräume), der Mittelliniensutur und der Osteolysen.



Abbildung 12: Gruppe IV, Maßstab: 1000µm, 20-fache Vergrößerung

In Gruppe IV stellt sich das Knochengewebe deutlich solider und strukturierter dar als in Gruppe II. Auch in dieser Gruppe zeigt sich ein ausgeprägtes, entzündlich infiltriertes Narbengewebe mit vereinzelten Nekrosen. Zu beiden Seiten der Mittellinie fand sich dem soliden Knochen aufgelagert osteoides Gewebe im Sinne von Knochenneubildung. Die Gesamtmessfeldfläche ist grün umrandet und beinhaltet die Fläche des Knochengewebes (einschließlich der Markräume und osteoidem Knochengewebe), der Mittelliniensutur und der Osteolysen.



7.1.3 Mikro-CT

Abbildung 13: Übersichtsbild, 19,23-fache Vergrößerung

Das Übersichtsbild zeigt den gesamten Mäuseschädel und dient zur Überprüfung der Positionierung des Präparates.

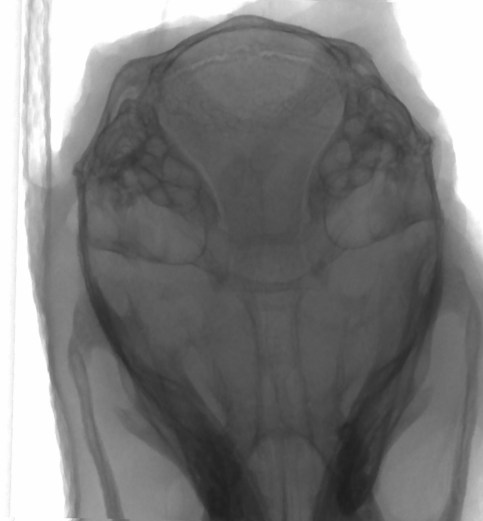


Abbildung 14: Rekonstruiertes Bild

Die Rekonstruktion ermöglicht eine anschließende Analyse der Bilder. Es wird ein Querschnittsbild des digitalisierten Knochens erstellt.

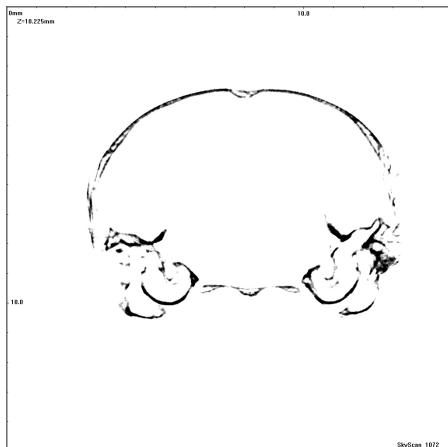


Abbildung 15: Auswahl des ROI

An den rekonstruierten Querschnittsbildern wurde eine „Region of interest“ (ROI) festgelegt, in deren Zentrum die Mittelliniensuturfläche zu liegen kam.

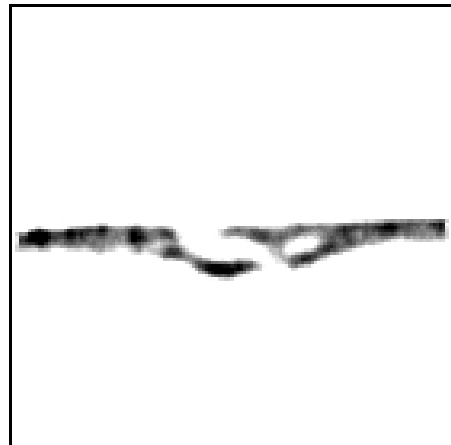


Abbildung 16: Gruppe I, 3-dimensionale Darstellung der Mittelliniensutur
Die 3-dimensionale Darstellung der Mittelliniensutur in Gruppe I zeigt einen kompakten Knochen ohne Osteolysen.

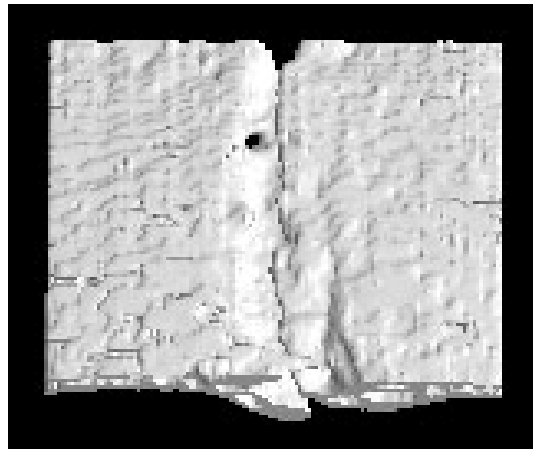


Abbildung 17 Gruppe II, 3-dimensionale Darstellung der Mittelliniensutur
Die 3-dimensionale Darstellung der Mittelliniensutur in Gruppe II zeigt eine deutlich aufgelockerte Knochenstruktur mit vielen großen Osteolysen.

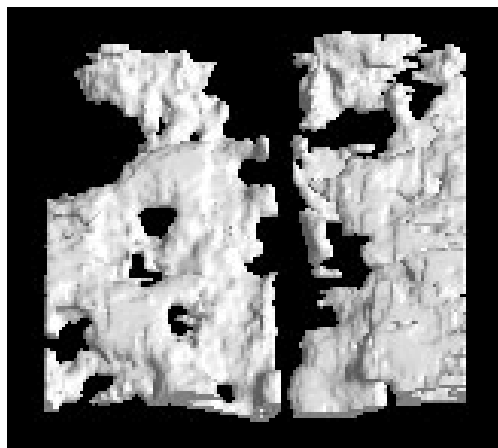


Abbildung 18 Gruppe III, 3-dimensionale Darstellung der Mittelliniensutur
Die 3-dimensionale Darstellung der Mittelliniensutur in Gruppe III zeigt wie in Gruppe I einen kompakten Knochen ohne Osteolysen.

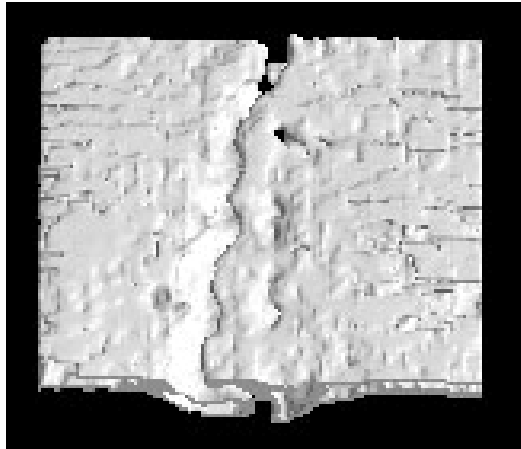
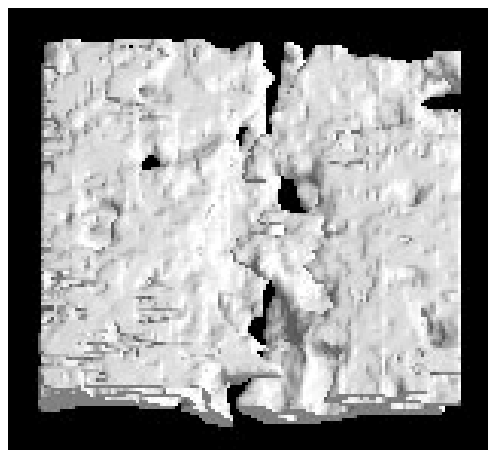


Abbildung 19 Gruppe IV, 3-dimensionale Darstellung der Mittelliniensutur
Die 3-dimensionale Darstellung der Mittelliniensutur in Gruppe IV zeigt eine leicht aufgelockerte Knochenstruktur mit vereinzelten Osteolysen.



7.1.4 Caspase-3-cleaved-Färbung

Abbildung 20: Gruppe II, Maßstab: 50µm.

In Gruppe II zeigte sich eine starke Anfärbung Makrophagen (↑) und Osteoblasten (→). Dies ist als Hinweis auf eine ausgeprägte apoptotische Reaktion der Zellen zu werten.

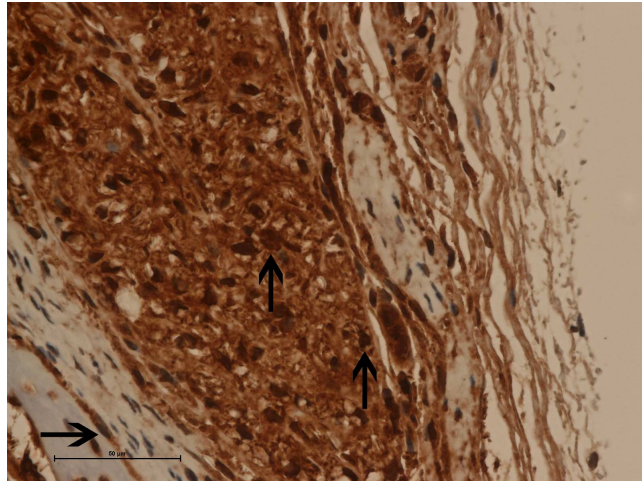


Abbildung 21: Gruppe II, Maßstab: 50µm.

Die schaumzellartigen Makrophagen (↓) waren nur schwach angefärbt. Diese Zellen waren nicht länger in der Lage apoptotische Zellüberreste aufzunehmen und können als Indikator für die Überlastung des apoptotischen Systems gewertet werden.

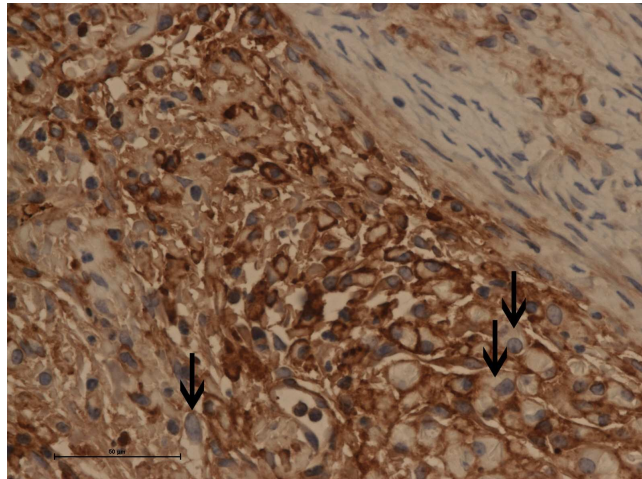


Abbildung 22: Gruppe IV, Maßstab: 50µm.

Im Vergleich zu Gruppe II zeigt sich hier eine geringere Anzahl sowie eine deutlich geringere Farbintensität der angefärbten Makrophagen (↑). Dies ist als Hinweis auf eine geringer ausgeprägte apoptotische Reaktion zu werten.

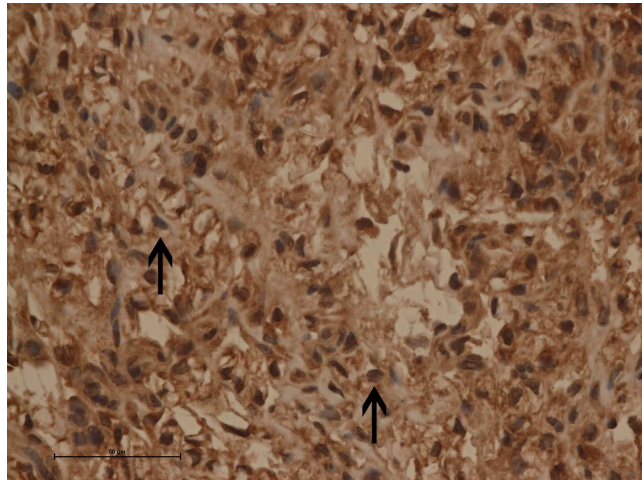
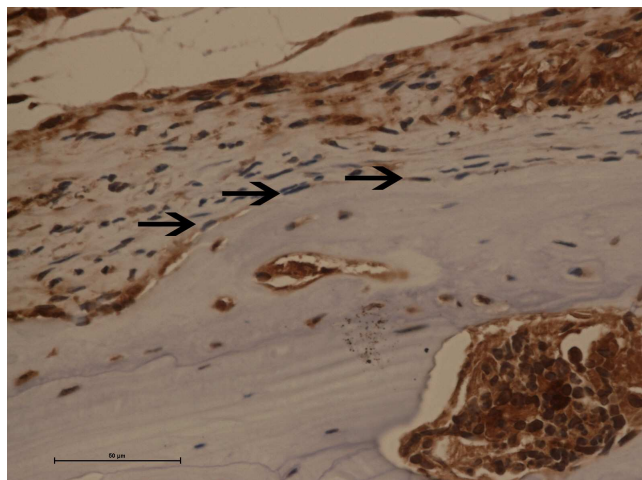


Abbildung 23: Gruppe IV, Maßstab: 50µm.

Im Vergleich zu Gruppe II zeigen die Osteoblasten (→) in Gruppe IV nur teilweise eine geringe Immunreaktion. Dies ist als Hinweis auf eine geringer ausgeprägte apoptotische Reaktion zu werten.



7.2 Herstellen und Färben der Präparate

Entkalkung

Die Entkalkung erfolgte über einen Zeitraum von 12 Stunden bei 37°C in einer neutralen EDTA Lösung in einem Ultraschall-Entkalkungsbad (Medite USE 33, MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland).

Ansatz

- 250g Titriplex III (Merck, Nr. 8421, Darmstadt, Deutschland) + 800ml Aqua dest. verrühren und erwärmen
- 50ml 40% Natronlauge zusetzen und sofort auf der Kochplatte unter Rühren erwärmen, bis eine klare Lösung entsteht
- mit Aqua dest. auf 980ml bringen
- pH-Wert auf 7,4 einstellen (bei zu niedrigem pH-Wert mit Natronlauge, bei zu hohem pH-Wert mit Eisessig)

Entwässerung

Die entkalkten Schädelknochen wurden über Nacht in einem vollständig geschlossenen Gewebeeinbettautomaten (Shandon Pathcentre, Thermo Electron Corporation, Basingstoke, England) entwässert und paraffiniert. Das System arbeitet mit den Einbettungsparametern Wärme, Vakuum, Druck und Agitation. Zunächst erfolgte eine Refixation mit 4%ig gepuffertem Formalin. Anschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 2 x 96%, 2 x 99%) entwässert. Die abschließende Entwässerung und Einparaffinierung erfolgte mit Xylol und Paraffin.

Ausguss in Paraffin

Nach der vollständigen Entwässerung wurden die Präparate in Paraffin ausgegossen. Hierzu wurde der Boden einer Ausgussform mit flüssigem Paraffin bedeckt und auf einer Kühlplatte kurz abgekühlt. Die Präparate wurden in einer Kapsel in die Ausgussform gelegt und mit flüssigem Paraffin bedeckt. Nach dem Aushärten und dem Entfernen der Ausgussform entstand so ein Paraffinblock.

Schneiden der Präparate und Aufbringen auf den Objektträger

Mittels eines Schlitten-Mikrotoms wurden von dem Block 4µm dicke Schnitte angefertigt und in einem Wasserbad gestreckt. Von dort wurden die Schnitte für die HE-Färbung auf einen unbeschichteten und für die Immunfärbung auf einen Superfrost Objektträger aufgebracht.

HE-Färbung

Für die HE-Färbung wurden die Präparate für 15 Minuten bei ca. 80°C im Wärmeschrank gelagert um das Paraffin abzuschmelzen und anschließend im Färbeautomat (Shandon Varistain Gemini, Thermo Electron Corporation, Basingstoke, England) standardisiert einer HE-Färbung (Merck, Darmstadt, Deutschland) unterzogen.

- 2x15 min. Xylol
- 2x2 min. Ethanol 100%
- 1x2 min. Ethanol 90%
- 1x2 min. Ethanol 70%
- spülen mit Wasser
- 3 min Färben in Mayers Hämalaun Lösung (Merck 109249, Darmstadt, Deutschland)
- Spülen in HCl Lösung 0,1%
- 3-5 min Differenzieren in fließendem Wasser
- 3-5 min Färben in Erythrosin B-Lösung 0,1% wässrig (Merck 115936, Darmstadt, Deutschland)
- Spülen in Wasser
- Aufsteigende Alkoholreihe
- Xylol

Abschließend erfolgte der Einschluss der Präparate im Eindeckautomaten. Die Präparate wurden mit Kunstharz und einem Deckglas eingedeckt.

Caspase-3-cleaved-Färbung

Für die immunhistochemische Caspase-3-cleaved-Färbung wurden die Paraffinschnitte nach dem Schneiden bei 52°C über Nacht getrocknet.

Anschließend wurden die Schnitte entparaffinisiert, im Autostainer (Autostainer, Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark) gefärbt und eingedeckt:

Entparaffinisierung

- 2x15 min. Xylol
- 2x2 min. Ethanol 100%
- 1x2 min. Ethanol 90%
- 1x2 min. Ethanol 70%
- spülen mit Wasser
- spülen im Waschpuffer (Zytomed Systems ZUC020)

Vorbehandlung

- 20 min. bei einem pH-Wert von 6,0 (ZUC028-500) im Wasserbad bei 98°C
- 20 min. abkühlen

Autostainer (Autostainer, Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark)

- 5 min. Peroxidase-Block (Dako. S2001)
- 1x10 min. Blocking Solution (Reag.1)
- 60 min Caspase-3 (Polyklonaler Antikörper, Verdünnung 1:200 Zytomed LOT: RBK009-05, Verdünnungsmedium Zytomed Systems, Berlin, Deutschland)
- 1x20 min. Postblock
- 1x30 min. HRP-Polymer (Reag.3)
- 1x10 min. DAB-Zytomed (DAB530)
- 1x5 min. Haematoxylin (1:8)

Eindecken

- Aufsteigende Alkoholreihe
- Xylol
- Eindecken mit Eukitt

7.3 Tabellen

Tabelle 1: Übersicht der Ergebnisse von Histomorphometrie, Mikro-CT und Mouse TRAP 5b Assay, aufgeführt als Mittelwert (Standardabweichung; Min - Max)

*BV = Bone volume, μ CT = Mikro-CT, BV/TV = relatives Knochenvolumen, BV-h = Gesamtgewebe in der Histomorphometrie, MSF = Mittelliniensuturfläche, + = im Vergleich zu Gruppe II

Methode*	Gruppe I (n=7)	p-Wert ⁺	Gruppe II (n=7)	p-Wert ⁺
BV-h (mm^2)	0,819 (0,263; 0,572 - 1,191)	0,939	0,810 (0,138; 0,609 - 1,026)	
MSF (mm^2)	0,040 (0,007; 0,028 - 0,049)	<0,001	0,083 (0,010; 0,066 - 0,097)	
MSF/BVh (%)	5,34 (1,89; 2,35 - 7,43)	<0,001	10,43 (1,83; 7,90 - 13,77)	
Osteolyse (mm^2)	0,001 (0,001; 0,00 - 0,002)	<0,001	0,059 (0,020; 0,031 - 0,082)	
Osteolyse/BVh (%)	0,14 (0,15; 0,00 - 0,41)	<0,001	7,44 (2,39; 3,02 - 9,72)	
BV (μ CT) (mm^2)	0,523 (0,033; 0,493 - 0,591)	0,039	0,493 (0,008; 0,486 - 0,506)	
BV/TV (μ CT) (%)	6,18 (0,39; 5,83 - 6,98)	0,034	5,81 (0,11; 5,70 - 5,99)	
Osteoklasten (N)	3,86 (1,86; 2 - 7)	<0,001	45,14 (20,42; 20 - 70)	
Trap 5b	0,078 (0,044; 0,011 - 0,127)	0,007	0,147 (0,036; 0,100 - 0,196)	

Methode*	Gruppe III (n=7)	p-Wert ⁺	Gruppe IV (n=7)	p-Wert ⁺
BV-h (mm^2)	0,740 (0,160; 0,523 - 1,036)	0,398	1,047 (0,256; 0,723 - 1,369)	0,052
MSF (mm^2)	0,046 (0,015; 0,031 - 0,072)	<0,001	0,056 (0,011; 0,043 - 0,073)	<0,001
MSF/BV-h (%)	6,16 (1,18; 4,39 - 7,43)	<0,001	5,63 (1,49; 3,64 - 7,62)	<0,001
Osteolyse (mm^2)	0,0003 (0,0004; 0,0 - 0,001)	<0,001	0,021 (0,006; 0,014 - 0,027)	<0,001
Osteolyse/BV-h (%)	0,05 (0,07; 0,00 - 0,15)	<0,001	2,14 (0,75; 1,28 bis 3,16)	<0,001
BV (μ CT) (mm^2)	0,530 (0,034; 0,493 - 0,598)	0,017	0,512 (0,021; 0,494 - 0,557)	0,048
BV/TV (μ CT) (%)	6,22 (0,38; 5,75 - 6,97)	0,019	5,98 (0,24; 5,75 bis 6,43)	0,104
Osteoklasten (N)	3,57 (1,51; 2 - 6)	<0,001	11,86 (4,06; 6 - 18)	0,001
Trap 5b	0,068 (0,025; 0,015 - 0,087)	<0,001	0,098 (0,046; 0,004 - 0,133)	0,046

Tabelle 2: Mittelliniensuturfläche in mm² - Histomorphometrie

Angegeben ist die histomorphometrisch bestimmte Größe der Mittelliniensuturfläche in mm² als Mittelwert für jedes einzelne Tier (1.1-1.7, 2.1-2.7, 3.1-3.7, 4.1-4.7) sowie für die gesamte Gruppe (Gruppe I-IV, n=7). Des Weiteren sind die Standardabweichung sowie der minimale (Min) und maximale (Max) Wert jeder Gruppe aufgeführt.

	Gruppe I		Gruppe II		Gruppe III		Gruppe IV	
	1.1	0,028	2.1	0,092	3.1	0,054	4.1	0,059
	1.2	0,034	2.2	0,084	3.2	0,072	4.2	0,051
	1.3	0,039	2.3	0,082	3.3	0,031	4.3	0,043
	1.4	0,045	2.4	0,085	3.4	0,039	4.4	0,059
	1.5	0,049	2.5	0,097	3.5	0,047	4.5	0,047
	1.6	0,040	2.6	0,066	3.6	0,031	4.6	0,063
	1.7	0,045	2.7	0,074	3.7	0,047	4.7	0,073
Mittelwert		0,040		0,083		0,046		0,056
Standardabweichung		0,007		0,010		0,015		0,011
Min		0,028		0,066		0,031		0,043
Max		0,049		0,097		0,072		0,073

Tabelle 3: Osteolyse in mm² - Histomorphometrie

Angegeben ist die histomorphometrisch bestimmte Größe der Fläche der außerhalb der Mittelliniensuturfläche entstandenen Osteolysen in mm² als Mittelwert für jedes einzelne Tier (1.1-1.7, 2.1-2.7, 3.1-3.7, 4.1-4.7) sowie für die gesamte Gruppe (Gruppe I-IV, n=7). Des Weiteren sind die Standardabweichung sowie der minimale (Min) und maximale (Max) Wert jeder Gruppe aufgeführt.

	Gruppe I		Gruppe II		Gruppe III		Gruppe IV	
	1.1	0,002	2.1	0,031	3.1	0,0010	4.1	0,018
	1.2	0,000	2.2	0,070	3.2	0,0000	4.2	0,014
	1.3	0,002	2.3	0,070	3.3	0,0001	4.3	0,015
	1.4	0,000	2.4	0,060	3.4	0,0008	4.4	0,027
	1.5	0,002	2.5	0,068	3.5	0,0003	4.5	0,023
	1.6	0,001	2.6	0,033	3.6	0,0000	4.6	0,027
	1.7	0,000	2.7	0,082	3.7	0,0000	4.7	0,027
Mittelwert		0,001		0,059		0,0003		0,021
Standardabweichung		0,001		0,020		0,0004		0,006
Min		0,000		0,031		0,000		0,014
Max		0,002		0,082		0,001		0,027

Tabelle 4: Gewebeverteilung – Histomorphometrie

Angegeben ist die histomorphometrisch bestimmte Gewebeverteilung, die Auskunft über den Anteil der unterschiedlichen histologischen Gewebearten am gemessenen Gesamtgewebe gibt. Die absoluten Flächen der Gewebearten Osteolysen und Mittelliniensuturfläche (MSF) wurden zum Gesamtknochen (in mm²) ins Verhältnis gesetzt und als Mittelwert für jedes einzelne Tier (1.1-1.7, 2.1-2.7, 3.1-3.7, 4.1-4.7) sowie für die gesamte Gruppe (Gruppe I-IV, n=7) in % angegeben. Des Weiteren sind die Standardabweichung (SD) sowie der minimale (Min) und maximale (Max) Wert jeder Gruppe aufgeführt.

Gruppe I	Gesamt-knochen in mm²	MSF in %	Osteolyse in %
1.1	1,183	2,35	0,17
1.2	0,660	5,15	0,00
1.3	0,572	6,82	0,41
1.4	1,191	3,78	0,00
1.5	0,657	7,43	0,30
1.6	0,829	4,83	0,12
1.7	0,641	7,02	0,00
Mittelwert	0,819	5,34	0,14
SD	0,263	1,89	0,15
Min	0,572	2,35	0,00
Max	1,191	7,43	0,41
Gruppe II			
2.1	1,026	8,97	3,02
2.2	0,779	10,81	9,03
2.3	0,810	10,16	8,68
2.4	0,809	10,51	7,43
2.5	0,704	13,77	9,72
2.6	0,609	10,88	5,46
2.7	0,934	7,90	8,74
Mittelwert	0,810	10,43	7,44
SD	0,138	1,83	2,39
Min	0,609	7,90	3,02
Max	1,026	13,77	9,72
Gruppe III	Gesamt-knochen in mm²	MSF in %	Osteolyse in %
3.1	0,733	7,37	0,14
3.2	1,036	6,99	0,00
3.3	0,622	4,96	0,02
3.4	0,523	7,43	0,15
3.5	0,767	6,11	0,04
3.6	0,704	4,39	0,00
3.7	0,797	5,88	0,00
Mittelwert	0,740	6,16	0,05
SD	0,160	1,18	0,07
Min	0,523	4,39	0,00
Max	1,036	7,43	0,15
Gruppe IV			
4.1	1,342	4,41	1,35
4.2	0,791	6,43	1,74
4.3	1,180	3,64	1,28
4.4	1,369	4,32	1,94
4.5	0,723	6,45	3,16
4.6	0,963	6,58	2,76
4.7	0,963	7,62	2,76
Mittelwert	1,047	5,63	2,14
SD	0,256	1,49	0,75
Min	0,723	3,64	1,28
Max	1,369	7,62	3,16

Tabelle 5: Knochenvolumen BV (Bone volume) in mm² – Mikro-CT

Angegeben ist die mikrotomographisch bestimmte Größe des Knochenvolumens BV in mm² als Mittelwert für jedes einzelne Tier (1.1-1.7, 2.1-2.7, 3.1-3.7, 4.1-4.7) sowie für die gesamte Gruppe (Gruppe I-IV, n=7). Des Weiteren sind die Standardabweichung sowie der minimale (Min) und maximale (Max) Wert jeder Gruppe aufgeführt.

	Gruppe I		Gruppe II		Gruppe III		Gruppe IV	
	1.1	0,496	2.1	0,506	3.1	0,529	4.1	0,501
	1.2	0,533	2.2	0,486	3.2	0,493	4.2	0,520
	1.3	0,505	2.3	0,490	3.3	0,598	4.3	0,557
	1.4	0,591	2.4	0,493	3.4	0,524	4.4	0,508
	1.5	0,522	2.5	0,489	3.5	0,525	4.5	0,494
	1.6	0,524	2.6	0,502	3.6	0,535	4.6	0,500
	1.7	0,493	2.7	0,486	3.7	0,503	4.7	0,505
Mittelwert		0,523		0,493		0,530		0,512
Standardabweichung		0,033		0,008		0,034		0,021
Min		0,493		0,486		0,493		0,494
Max		0,591		0,506		0,598		0,557

Tabelle 6: Relatives Knochenvolumen BV/TV (Bone density) in % – Mikro-CT
 Angegeben ist das mikrotomographisch bestimmte relative Knochenvolumen BV/TV in % als Mittelwert für jedes einzelne Tier (1.1-1.7, 2.1-2.7, 3.1-3.7, 4.1-4.7) sowie für die gesamte Gruppe (Gruppe I-IV, n=7). Des Weiteren sind die Standardabweichung sowie der minimale (Min) und maximale (Max) Wert jeder Gruppe aufgeführt.

	Gruppe I		Gruppe II		Gruppe III		Gruppe IV	
	1.1	5,86	2.1	5,99	3.1	6,25	4.1	5,84
	1.2	6,30	2.2	5,75	3.2	5,75	4.2	6,14
	1.3	5,96	2.3	5,82	3.3	6,97	4.3	6,43
	1.4	6,98	2.4	5,75	3.4	6,10	4.4	6,01
	1.5	6,16	2.5	5,70	3.5	6,20	4.5	5,75
	1.6	6,17	2.6	5,93	3.6	6,32	4.6	5,83
	1.7	5,83	2.7	5,74	3.7	5,94	4.7	5,89
Mittelwert		6,18		5,81		6,22		5,98
Standardabweichung		0,39		0,11		0,38		0,24
Min		5,83		5,70		5,75		5,75
Max		6,98		5,99		6,97		6,43

Tabelle 7: Mouse TRAP 5b Assay in U/L

Angegeben sind die Serumspiegel von TRAP 5b in U/L als Kennziffer für die Anzahl der aktivierten Osteoklasten im Blut für jedes einzelne Tier (1.1-1.7, 2.1-2.7, 3.1-3.7, 4.1-4.7) sowie als Mittelwert für die gesamte Gruppe (Gruppe I-IV, n=7). Des Weiteren sind die Standardabweichung sowie der minimale (Min) und maximale (Max) Wert jeder Gruppe aufgeführt.

	Gruppe I		Gruppe II		Gruppe III		Gruppe IV	
	1.1	0,011	2.1	0,196	3.1	0,015	4.1	0,004
	1.2	0,127	2.2	0,100	3.2	0,066	4.2	0,133
	1.3	0,093	2.3	0,122	3.3	0,087	4.3	0,122
	1.4	0,046	2.4	0,138	3.4	0,078	4.4	0,085
	1.5	0,127	2.5	0,139	3.5	0,066	4.5	0,133
	1.6	0,093	2.6	0,138	3.6	0,087	4.6	0,122
	1.7	0,046	2.7	0,196	3.7	0,078	4.7	0,085
Mittelwert		0,078		0,147		0,068		0,098
Standardabweichung		0,044		0,036		0,025		0,046
Min		0,011		0,100		0,015		0,004
Max		0,127		0,196		0,087		0,133

7.4 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Apaf-1	apoptotischer Protease Aktivierungsfaktor-1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCR/ABL	breakpoint cluster region/Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog
BOC-D-FMK	t-butoxycarbonyl-aspartate-fluoromethyl-keton
BV	Bone volume
bzw.	beziehungsweise
CAD	Caspase-activated Dnase
CARD	Caspase recruitment domains
CCD	Charged-Coupled-Device
CD95L	CD95 Ligand
CT	Computertomograph
DD	Death domain
DED	Death effector domains
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid = Desoxyribonukleinsäure
ECFC	Erythroid-colony-forming cell
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FADD	Fas-associated death domain
FOV	field of view
HE-Färbung	Hämatoxylin Eosin-Färbung
HRP	Horse Radish Peroxidase
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
ICAD	Inhibitory Caspase-activated Dnase
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
LAL	Limulus Amöbozyten Lysat

Min	Minimum
Max	Maximum
MCP-1	Monozyten Chemoattractant Protein-1
MCP-2	Monozyten Chemoattractant Protein-2
μ -CT	Mikro-Computertomographie
MMP-1	Matrix-Metalloproteinase-1
NaCl	Natrium-Chlorid
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PBS	Phosphate buffered saline = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEP	Polyethylenpartikeln
PGE2	Prostaglandin E2
PMMA	Polymethylmethacrylat
pNPP	para-Nitrophenyl-Phosphat
RIP	receptor interacting protein
RNA	Ribonucleic Acid = Ribonukleinsäure
ROI	Region of interest
rpm	rounds per minute
SD	Standardabweichung
Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP-binding protein with low pI
TBS	Tris-buffered saline
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TIF	Tagged Image File Format
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
TNFR1	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1
TRADD	TNFR-associated death domain
TRAF2	TNFR-associated factor 2
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase
TV	Tissue volume
U.a.	unter anderem
UHMWPE	Ultrahochmolekulargewichtiges Polyethylen
VOI	Volume of interest
zVAD-FMK	carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone

8 Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Marius von Knoch für die Überlassung des Themas und die organisatorische Unterstützung danken.

Größter Dank gilt Herrn Dr. med. Stefan Landgraeber und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Christian Wedemeyer, die mich beim Schreiben dieser Arbeit betreut haben. Für die damit verbundene hervorragende Unterstützung, die unkomplizierten und effektiven Hilfestellungen und die extrem schnelle Beantwortung aller Fragen möchte ich mich herzlich bedanken.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Franz Lör, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Abteilung meine Dissertation durchzuführen.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Gero Hilken, der mich bei der Arbeit mit den Versuchstieren angeleitet und mir bei den Operationen geholfen hat. Vielen Dank auch an das Team des Zentralen Tierlabors der Universität Duisburg-Essen, das mir bei der täglichen Versorgung der Tiere immer zur Seite stand und eine komplikationslose Zusammenarbeit ermöglichte.

Großen Dank an Guido Marquitan für die fachkräftige Beratung bei der Durchführung des ELISAs und für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. med. R. Erbel, Leiter der Abteilung für Kardiologie des Westdeutschen Herzzentrums der Universität Duisburg-Essen, der das Mikro-CT für diese Dissertation zur Verfügung stellte.

Herzlichen Dank an Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Martin Tötsch für die Überlassung eines Mikroskop-Arbeitsplatzes und die Bereitstellung seines Fachwissens. Herzlichen Dank auch an das Team der Pathologie des Universitätsklinikums Essen für die außerordentliche Hilfe bei der histologischen Aufbereitung der Mäusekalvariae und dem Färben der Knochenschnitte.

Weiterer Dank gilt Herrn Detlef Pütz von der Firma NIKON für die Einweisung in das Computerprogramm NIS Elements und der effektiven Unterstützung bei der Lösung von Problemen.

Ganz lieben Dank an meine Eltern und meinen Bruder, die mich während der ganzen Zeit unterstützt und zum Weitermachen ermutigt haben sowie für die Durchsicht und sprachliche Korrektur dieser Arbeit.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Tim Heuer für die Unterstützung und die große Hilfe bei jeglichen Computerproblemen.

Herzlichen Dank auch an Frau Birgitt Heuer für die Durchsicht und sprachliche Korrektur dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei all denjenigen bedanken, die hier nicht namentlich genannt sind, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich unterstützt haben.